Archive of SID

بررسی تجربی انتقال عمودی مقادیر متفاوت سالمونلا انتریتیدیس در جوجه‌های گوشتی

محمدصادق مددی[1*]، کامیار یوسفی[2]

۱. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.
۲. دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.

دریافت: ۳۰ مهر ماه ۹۳ **پذیرش:** ۳۰ تیر ماه ۹۴

چکیده

سالمونلا همچنان اصلی‌ترین بیماری است که از طریق غذا به انسان انتقال می‌یابد. طیور یکی از منابع مهم شناخته‌شده آلودگی با سالمونلا هستند و سالمونلوز ناشی از باکتری سالمونلا انتریتیدیس در اثر مصرف تخم‌مرغ و یا گوشت آلوده طیور ایجاد می‌شود. یکی از ویژگی‌های برجسته و مهم این باکتری، توانایی منحصربه‌فرد آن در تولید تخم‌مرغ آلوده و انتقال عمودی آلودگی، بدون ایجاد بیماری ظاهری در پرندگان تخم‌گذار است. طی این پژوهش دو مقدار متفاوت باکتری سالمونلا انتریتیدیس داخل آلبومن تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار تلقیح و چگونگی انتقال عمودی باکتری در جوجه‌های هچ شده تا روز ۲۸ دوره پرورش بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که دفع مدفوعی سالمونلا در گروهی که باکتری بیشتری دریافت کرده بودند همواره بیشتر از پرنده‌های گروه دیگر بود. تناوب در میزان جداسازی باکتری سالمونلا از بافت‌های روده، سکوم و کبد پرنده‌های دو گروه بررسی شد به‌طوری‌که در اوایل و اواخر دوره‌ی پرورش، میزان جداسازی باکتری سالمونلا در پرنده‌هایی که میزان باکتری بیشتری دریافت کرده بودند (گروه یک) بالاتر بود و به‌طورکلی میزان جداسازی باکتری سالمونلا و دفع مدفوعی جوجه‌های گروه یک بیشتر از گروه دو بود. به منظور شناسایی و تأیید حضور باکتری‌های سالمونلا انتریتیدیس جداشده از بافت‌های مختلف دو گروه مورد مطالعه از آزمایش مولتی‌پلکس پی سی آر استفاده شد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار، جوجه گوشتی، انتقال عمودی

مقدمه

سالمونلا همچنان اصلی‌ترین بیماری است که از طریق غذا به انسان انتقال می‌یابد. در سال ۲۰۰۶ میلادی تعداد ۱۶۰۶۴۵ مورد ابتلای انسانی به سالمونلوز، در ۲۵ کشور عضو اتحادیه اروپا گزارش شد (۳۵/۴ مورد ابتلا در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر)، در این زمان سالمونلوز دومین عامل بروز مشکلات گوارشی در اروپا به‌شمار می‌رفت (۱۲)؛ در طی سال‌های اخیر نیز، شیوع آلودگی انسانی و مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا به‌طور چشم‌گیری در اروپا، آمریکا و دیگر نقاط جهان افزایش یافته است و طیور یکی از منابع مهم انتقال سالمونلاست. از سال ۱۹۸۷ تاکنون سالمونلا انتریتیدیس به‌عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد مسمومیت، حاصل از تولیدات طیور، در انسان شناخته شده است (۱۴). سالمونلوز ناشی از باکتری سالمونلا انتریتیدیس بیشتر با مصرف تخم‌مرغ‌های آلوده و یا محصولاتی که در تهیه آن‌ها تخم‌مرغ استفاده‌شده، ایجاد می‌شود. گوشت‌های آلوده طیور نیز در ایجاد آلودگی‌های ناشی از سالمونلا مؤثرند (۱۸). پژوهش‌های لاهورتا و همکاران در سال ۲۰۱۰، بر روی تخم‌مرغ‌ها نشان داد که ۰/۸ درصد تخم‌مرغ‌ها آلوده به سالمونلا بودند و بیشتر از ۹۰ درصد آلودگی‌های ناشی از سالمونلا از طریق سروتیپ سالمونلا انتریتیدیس ایجاد می‌شود.

* پست الکترونیک نویسنده ی مسؤول: madadi@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از ویژگی‌های برجسته و مهم این باکتری، توانایی منحصربه‌فرد آن در ایجاد آلودگی در تخم‌مرغ است بدون این که در پرندگان تخم‌گذار بیماری ظاهری ایجاد کند؛ که این خصوصیت، شناسایی پرندگان آلوده و کنترل این بیماری را با مشکل روبرو می‌کند (۱۱). به نظر می‌رسد سالمونلا انتریتیدیس خصوصیاتی ذاتی دارد که موجب ماندگاری بیشتر این باکتری درون تخم‌مرغ و نیز جایگزینی بهتر این باکتری در ارگان‌های تولیدمثلی مرغ‌های تخم‌گذار می‌شود (۶).

حضور این ارگانیسم در محیط‌های پرورش طیور موجب انتشار مداوم آلودگی در مرغ‌های مولد و جوجه‌های هچ شده می‌شود (۳). آلودگی جوجه‌های یک‌روزه در مرغداری‌ها با سالمونلا، می‌تواند ناشی از هر دو نوع انتقال عمودی یا افقی باشد؛ در روش انتقال عمودی، آلودگی از مرغ مادر مولّد و یا جوجه‌کشی به نتاج منتقل می‌شود درحالی‌که در انتقال افقی، محیط مرغداری آلوده به سالمونلاست و در اثر تماس جوجه‌ها با محیط پرورش، آلودگی به جوجه‌ها منتقل می‌شود (۱۳). مهم‌ترین مرحله در بیماری‌زایی سالمونلا، ورود باکتری از سطح سلول‌های اپی تلیومی دستگاه گوارش به ویژه سلول‌های اپی‌تلیومی ناحیه سکوم است (۴). سالمونلا از طریق بازآرایی سیستم سیتواسکلتون سلول‌های اپی‌تلیومی و ایجاد حفره در دیواره آن‌ها وارد می‌شود (۵).

آلودگی پرنده‌های تخم‌گذار با سالمونلا انتریتیدیس از طریق مجرای گوارشی، منجر به تهاجم باکتری به ارگان‌های داخلی ازجمله تخمدان و اویداکت شده (۷) و موجب تولید تخم‌مرغ‌های آلوده به سالمونلا می‌شود، بدین ترتیب آلودگی سالمونلا به جوجه‌های نسل بعد نیز منتقل می‌شود (۱۵).

هدف از این پژوهش ایجاد مقادیر متفاوت آلودگی در تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار و بررسی میزان انتقال عمودی سالمونلا انتریتیدیس در جوجه‌های گوشتی در طی دوره پرورش است. طی این مطالعه ارتباط تعداد متفاوت باکتری سالمونلا انتریتیدیس با تعداد باکتری سالمونلای جداشده از ارگان‌های مختلف جوجه‌های گوشتی آلوده بررسی شد.

مواد و روش کار

باکتری سالمونلای استفاده‌شده در این پژوهش سالمونلا انتریتیدیس فاژتایپ ۴ سویه NIDO 76Sa88 Nalr بود که از دانشکده دامپزشکی دانشگاه گنت بلژیک تهیه و در این مطالعه به‌عنوان سویه استاندارد استفاده شد. این سویه در برابر آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید مقاوم است و خصوصیات این باکتری کاملاً شناخته شده است.

برای این مطالعه تعداد ۴۰۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار عاری از سالمونلا تهیه و به دو گروه ۲۰۰ عددی تقسیم شد. نخست، به‌منظور اطمینان از عاری بودن مرغ‌های فارم مولد به سالمونلا، از مرغ‌های تأمین‌کننده تخم‌مرغ، خون‌گیری و سواب کلوآکی تهیه شد و با استفاده از آزمایش الیزا و کشت باکتریایی، از سالم بودن آن‌ها اطمینان حاصل گردید؛ پیش از آغاز آزمایش نیز از تعدادی از تخم‌مرغ‌های تهیه‌شده کشت باکتریایی به عمل آمده و منفی بودن آن‌ها تأیید شد.

با توجه به میزان متفاوت آلودگی تخم‌مرغ‌ها با باکتری سالمونلا در مطالعات پیشین (۳ و ۱۰)، دو گروه تخم‌مرغ مورد نظر، با دو مقدار متفاوت ۱۷۰ و ۱۷ CFU (Colony Forming Unit) از باکتری سالمونلا انتریتیدیس تلقیح شدند. برای این کار پوسته یک‌طرف تخم‌مرغ‌ها با استفاده از پنبه آغشته به الکل ضدعفونی و با سوزن استریل، لایه بیرونی آن به‌آرامی سوراخ شد سپس با سرنگ انسولین مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر محلول PBS حاوی ۱۷۰ و ۱۷ CFU باکتری سالمونلا انتریتیدیس (سوش استاندارد) به داخل آلبومن تخم‌مرغ‌های دو گروه تلقیح شد. سرانجام محل سوراخ شده با چسب مایع بسته شد.

تخم‌مرغ‌ها برای گذراندن دوره انکوباسیون طبیعی، در دو دستگاه جوجه‌کشی جدا از هم قرار داده شدند. پس از هچ، تعداد ۳۴ قطعه جوجه به‌طور تصادفی از هر گروه

www.SID.ir

Archive of SID

انتخاب شد و آن‌گاه در ۲ اتاق عاری از باکتری و کاملاً جدا تحت شرایط استاندارد نگه‌داری و تا آخر دوره آزمایش با آب و دان غیر آلوده تغذیه شدند.

در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ از دوره پرورش، پس از تهیه سواب کلواکی از همه‌ی جوجه‌ها، در هر مرحله تعداد ۲ قطعه جوجه از هر گروه، بدون خونریزی و با روش شکستن مهره پشت گردنی کشتار می‌شدند و بافت‌های آن‌ها شامل کبد و طحال با هم و روده‌های باریک و سکوم هریک جداگانه برداشته می‌شدند سپس محتویات روده تخلیه می‌گردید و کلنی باکتری در هر گرم از بافت‌های موردنظر شمارش می‌شد، در پایان، میانگین تعداد باکتری از بافت دو قطعه جوجه به‌عنوان عدد نهایی اعلام می‌گردید.

به‌منظور بررسی دفع مدفوعی سالمونلا، سواب از ناحیه کلواک پرنده تهیه و بلافاصله در لوله استریلی حاوی ۵ سی‌سی سلنیت سیستئین قرار داده می‌شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط سالمونلا-شیگلا آگار به‌صورتی کشت داده می‌شد تا کلنی تک حاصل گردد. محیط سالمونلا شیگلا آگار به مدت ۲۴ ساعت در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شد. سپس برای تأیید کلنی‌های مشکوک به سالمونلا، در محیط TSI و اوره دوباره کشت داده شدند.

برای شمارش باکتری از ارگان‌های داخلی نخست ارگان‌های مربوط به سیستم گوارشی به‌صورت استریل زیر هود و کنار شعله از داخل بدن پرنده کالبدگشایی شده، در هاون‌هایی که از قبل استریل شده بودند، منتقل می‌گردید. از ارگان‌های یاد شده، بافت هموژن تهیه می‌گردید و سپس در لوله‌های حاوی PBS، عمل رقیق‌سازی پیاپی انجام می‌شد و در محیط سالمونلا شیگلا آگار به روشی کشت داده می‌شد تا درپایان کلنی‌ها به‌صورت تک رشد کنند و قابل‌شمارش باشند (۱).

برای محاسبه تعداد باکتری موجود در هر گرم (CFU) از ارگان‌های مربوط به پرنده‌های مورد آزمایش، کلنی‌های سالمونلا در پلیت های آگار که ۳۰۰-۳۰ عدد کلنی سالمونلا داشتند شمارش می‌شدند و تعداد باکتری در هر گرم از بافت طبق پروتکل محاسبه می‌شد (۹).

DNA باکتری‌های جداشده از نمونه‌های بافتی با روش جوشاندن، استخراج شد و برای تشخیص جنس و گونه انتریتیدیس در سالمونلاها ژن‌های spv ،ST و SefA و روش مولتی پلکس پی سی آر برای تکثیر ژنها استفاده شد (جدول ۱).

پرایمر ST اختصاصی سالمونلا، پرایمر spv اختصاصی پلاسمیدهای حدت زا و SefA پرایمر تشخیصی اختصاصی سروار انتریتیدیس هستند (۱۶). ردیف بازهای پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شدند (جدول ۱).

همه واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل DNA استخراج‌شده، بافر PCR (۲۰ میکرومول Tris-HCl با PH=۸/۴، ۵۰ میکرومول پتاسیم کلرید)، ۱/۵ میکرومول منیزیم کلرید، ۰/۲۵ میکرومول dNTPs، ۱

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در انجام آزمایش PCR

نام توالی هدف	توالی پرایمر	طول محصول تکثیر (bp)
ST	F-5'GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA3'	۴۲۹
	R-5'GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG3'	
Spv	F-5'GCCGTACACGAGCTTATAGA3'	۲۵۰
	R-5'ACCTACAGGGGCACAATAAC3'	
SefA	F-5'GCAGCGGTTACTATTGCAGC3'	۳۱۰
	R-5'TGTACAGGGACATTTAGCG3'	

www.SID.ir

Archive of SID

واحد آنزیم Taq پلی‌مراز و ۱ واحد پرایمر انجام گرفت.

برنامه سیکل حرارتی در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Techne) بدین‌صورت بود که واکنش در ۳۵ سیکل شامل مراحل واسرشت (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (Annealing) در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، مرحله تکثیر اولیه (Primer Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن مرحله تکثیر پایانی (Terminal Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۱۶).

فرآورده‌های تکثیر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و از Ladder ۱۰۰ جفت بازی به‌عنوان نشانگر وزن مولکولی استفاده گردید. ژل آگارز با اتیدیوم بروماید (۲-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی شد و پس از شست‌وشو در آب، بر روی دستگاه ماورای‌بنفش (UVidoc) قرار داده شد و با دوربین مخصوص و چاپگر، عکس ژل تهیه و نتایج بررسی گردید.

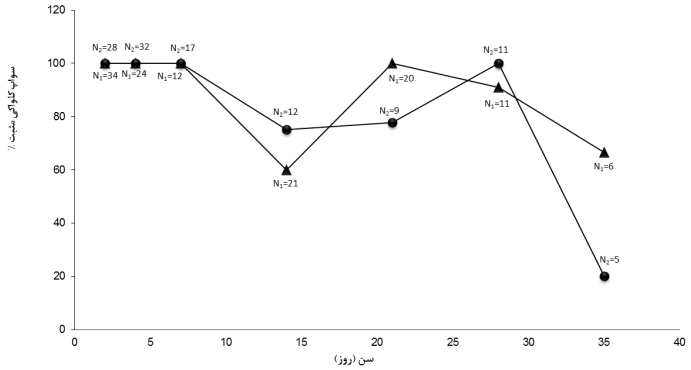
نتایج

در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ دوره پرورش، از همه جوجه‌ها سواب کلواکی تهیه شد تا میزان دفع مدفوعی سالمونلا ارزیابی شود. صد در صد سواب‌های کلواکی تهیه‌شده از جوجه‌های گروه اول (۱۷۰ CFU) در روزهای ۲، ۴، ۷ و ۲۱ و گروه دوم (۱۷CFU) در روزهای ۲، ۴، ۷ و ۲۸ دوره پرورش مثبت بود.

درصد دفع مدفوعی سالمونلا در جوجه‌های گروه یک در روزهای ۱۴ و ۲۸ به ترتیب ۶۰ و ۹۰ درصد و در گروه دوم به ترتیب ۷۵ و ۷۷ درصد بود (نمودار ۱).

در نمودارهای شماره ۲ تا ۴ تعداد باکتری سالمونلا انتریدیتیس در بافت‌های مختلف جوجه‌های دو گروه موردمطالعه نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود از هر گرم بافت کبد جوجه‌های گروه یک (۱۷۰ CFU) در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تلقیح به ترتیب تعداد $۶/۷\times۱۰^{۵}$، ۱۰، $۲/۷۵\times۱۰^{۲}$، ۵، ۵ و ۱۰ باکتری سالمونلا جدا شده است؛ اما از هر گرم بافت کبد جوجه‌های گروه دو در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تلقیح به ترتیب تعداد $۱۰^{۲}\times۴$، ۱۰، ۱۰، ۷×۱۰^{۳}، ۰ و ۱۰ باکتری جدا شد (نمودار ۲).

از هر گرم بافت روده باریک جوجه‌های گروه یک، در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تلقیح به ترتیب تعداد $۲/۸\times۱۰^{۶}$، $۲/۵\times۱۰^{۲}$، ۳×۱۰^{۲}، ۹×۱۰^{۳}، $۳/۳\times۱۰^{۳}$ و $۲/۵\times۱۰^{۳}$ باکتری سالمونلا جدا شد اما از هر گرم بافت



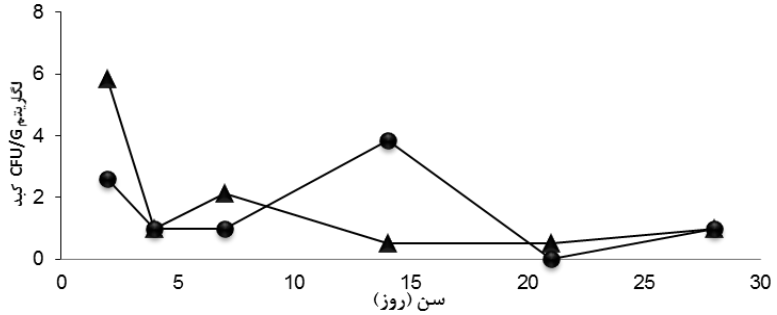
نمودار ۱- درصد جوجه‌های مثبت در سواپ کلواکی: جوجه‌های گروه یک ۱۷۰CFU (▲) و گروه دو ۱۷CFU (●)
N۱: تعداد جوجه‌های گروه یک و N۲: تعداد جوجه‌های گروه دو، در روز آزمایش

www.SID.ir

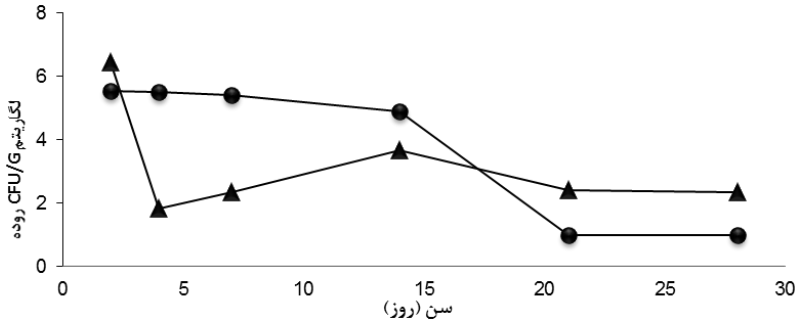
Archive of SID

روده باریک جوجه‌های گروه دو در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تلقیح به ترتیب تعداد $۳/۶\times۱۰^{۵}$، $۳/۲\times۱۰^{۵}$، $۲/۶۷\times۱۰^{۵}$، $۷/۷\times۱۰^{۴}$، ۱۰ و ۱۰ باکتری جدا شد (نمودار ۳).

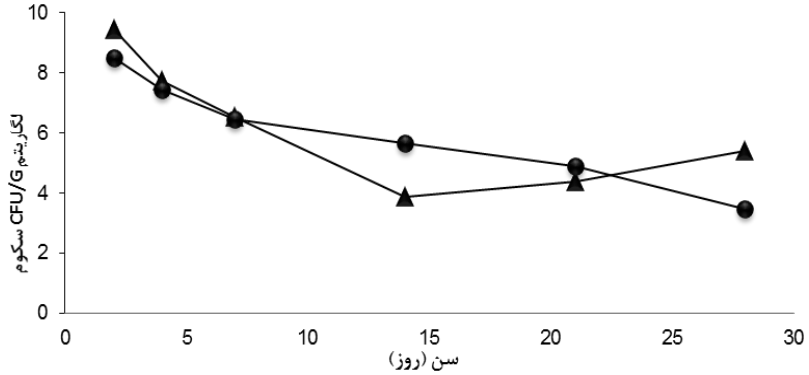
میزان آلودگی بافت سکوم در جوجه‌های گروه یک در حد بسیار بالایی بود، به‌طوری‌که در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تلقیح به ترتیب تعداد $۳/۸۴\times۱۰^{۹}$، $۳/۴\times۱۰^{۸}$، $۱/۳\times۱۰^{۷}$، ۸×۱۰^{۳}، $۲/۳\times۱۰^{۴}$ و $۳/۲\times۱۰^{۵}$ باکتری سالمونلا جدا شد؛ اما از هر گرم سکوم جوجه‌های گروه دو در روزهای ۲، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تلقیح به ترتیب تعداد $۳/۱\times۱۰^{۸}$، $۲/۸\times۱۰^{۷}$، ۳×۱۰^{۶}، $۴/۷\times۱۰^{۵}$، ۸×۱۰^{۴} و ۳×۱۰^{۳} باکتری جدا شد (نمودار ۴).



نمودار ۲- لگاریتم تعداد باکتری جداشده از هر گرم بافت کبد
گروه یک (▲) و گروه دو (●)



نمودار ۳- لگاریتم تعداد باکتری جداشده از هر گرم بافت روده
گروه یک (▲) و گروه دو (●)



نمودار ۴- لگاریتم تعداد باکتری جداشده از هر گرم بافت سکوم
گروه یک ۱۷۰CFU (▲) و گروه دو ۱۷CFU (●)

www.SID.ir

Archive of SID

به‌منظور تأیید و شناسایی دقیق‌تر باکتری‌های جداشده از بافت‌های مختلف پرنده‌های دو گروه، آزمایش مولتی پلکس پی سی آر بر روی جدایه های سالمونلا انجام گرفت و سه ژن مشخصه سالمونلا انتریتیدیس شناسایی شد (اشکال ۱ و ۲).

بحث

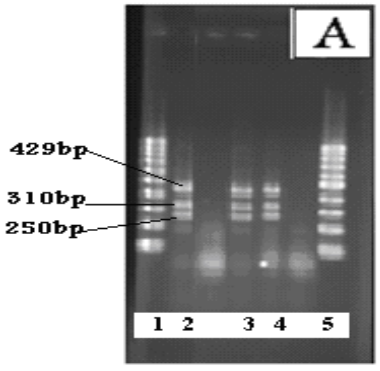
سالمونلوز هنوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز در انسان‌ها به‌شمار می‌رود (۱۷). علی‌رغم ارتباط واضح میان مسمومیت‌های غذایی و باکتری سالمونلا انتریتیدیس و مصرف تخم‌مرغ‌های پخته نشده، هنوز جوجه‌های گوشتی به‌عنوان مهم‌ترین مخزن این ارگانیسم به‌شمار می‌روند. آلودگی جوجه‌های گوشتی در طی چند روز اول زندگی، با مرگ‌ومیر زیادی همراهند و بیشتر در اثر انتقالی عمودی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* رخ می‌دهد. جوجه‌های آلوده دچار عفونت کیسه زرده و پریکاردیت شده و تلف می‌شوند و در صورت زنده‌مانی رشد کافی ندارند و در مراحل بعدی پرورش حذف می‌شوند.

بیماری‌زایی سروتیپ‌هایی نظیر *سالمونلا انتریتیدیس* در جوجه‌های گوشتی هنوز شناخته نشده است و رابطه بین میزبان – سالمونلا و چگونگی انتقال عمودی باکتری از طریق تلقیح مقادیر متفاوت سالمونلا در تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار به‌صورت تجربی می‌تواند موردبررسی قرار گیرد (۸). چگونگی حرکت و جایگزینی سالمونلا در ماکیان هنوز شناخته نشده است.

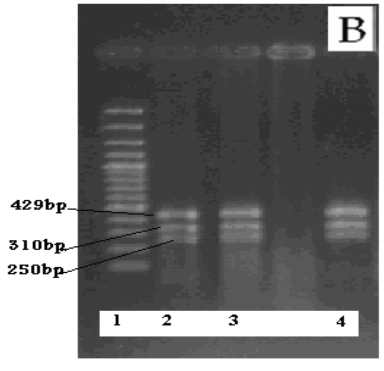
طی این پژوهش دو مقدار متفاوت باکتری سالمونلا انتریتیدیس داخل آلبومن تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار تلقیح و چگونگی انتقال عمودی باکتری در جوجه‌های هچ شده تا روز ۲۸ دوره پرورش مطالعه شد.

تلقیح دو مقدار متفاوت باکتری (۱۷ CFU و ۱۷۰) در تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار نشان داد که دفع مدفوعی سالمونلا در هر دو گروه پرنده‌های هچ شده تا روز ۷ دوره پرورش بالا بود و پس از آن در گروهی که میزان باکتری بیشتری دریافت کردند میزان دفع مدفوعی سالمونلا بیشتر از پرنده‌های گروه دیگر بود.

Imersil و همکاران در سال ۲۰۰۴، طی مطالعه‌ای در مرغ‌های تخم‌گذار نشان دادند که در دو گروه آلوده‌شده با مقادیر بالا و پایین باکتری تا هفته ۱۰ پس از آلودگی، میزان دفع مدفوعی سالمونلا در گروهی که میزان بالاتری سالمونلا دریافت کرده بودند بیشتر بود. از هفته ۱۰ تا ۱۸ موارد مثبت در گروهی که میزان کمتری دریافت کرده بودند بیشتر و سرانجام پس از هفته ۱۸ دوره پرورش،



شکل ۱- نتایج آزمایش Multi-PCR بر روی جدایه های *سالمونلا انتریتیدیس* گروه اول. ۵ و ۱- ژن رولر (GeneRuler 100bp, 80-1000bp, Ready-To-Use-Cinnagen)؛ ۲- کنترل مثبت؛ ۳- سالمونلا انتریتیدیس جداشده از سواب کلواکی ۴- سالمونلا انتریتیدیس جداشده از کبد



شکل ۲- نتایج آزمایش Multi-PCR بر روی جدایه های سالمونلا انتریتیدیس گروه دوم. ۱،۵- ژن رولر؛ ۲- (کنترل مثبت)؛ ۳- *سالمونلا انتریتیدیس* جداشده از سواب کلواکی ۴- *سالمونلا انتریتیدیس* جداشده از کبد

www.SID.ir

Archive of SID

تفاوت چندانی بین دو گروه موردمطالعه مشاهده نشد. این پژوهشگران عنوان کردند که این مطلب می‌تواند ناشی از ایجاد عفونت پایدار توسط میزان پایین باکتری سالمونلا باشد. مشابه مطالعه بالا، تناوب در میزان جداسازی سالمونلا در بررسی حاضر نیز مشاهده شد.

Cardoso و همکاران در سال ۲۰۱۳، طی مطالعه‌ای در کبوترها نشان دادند که تا ۱۴ روز پس از تلقیح، دفع مدفوعی در هر دو گروه آلوده با مقادیر بالا و پایین سالمونلا وجود داشت اما در گروهی که مقدار بیشتری از باکتری دریافت کرده بود، دفع مدفوعی در روزهای ۳ و ۷ پس از تلقیح بیشتر بود (۲).

Gast و همکاران در سال ۲۰۱۱، طی مطالعه‌ای در مرغ‌های تخم‌گذار نشان دادند که در یک هفته پس از تلقیح باکتری، درصد دفع مدفوعی در گروهی که باکتری کمتری دریافت کردند ۲۳/۸ و در گروهی که باکتری بیشتری دریافت کردند ۸۷/۵ بود. در گروهی که باکتری کمتری دریافت کرده بود، ۳ هفته پس از تلقیح موارد مثبتی دیده نشد اما در گروهی که مقادیر بیشتر باکتری را دریافت کرده بود دفع مدفوعی هرچند به میزان اندک تا هفته ۸ پس از تلقیح ادامه داشت. آن‌ها عنوان کردند که مقادیر دریافتی باکتری، اثر قابل‌ملاحظه‌ای روی مقدار و طول مدت دفع باکتری دارد (۱۰).

طی این پژوهش، میزان جداسازی باکتری سالمونلا از سکوم جوجه‌های گروه یک (۱۷۰CFU) تا روز هفتم دوره پرورش بالاتر از گروه دیگر بود؛ در روزهای ۱۴ و ۲۱ کمتر، لیکن پس از آن میزان بیشتری باکتری سالمونلا جدا شده است.

در پژوهش حاضر نیز، از روده گروه یک (۱۷۰CFU) در روز ۲ دوره پرورش، تعداد بیشتری باکتری سالمونلا جدا شد؛ لیکن در روزهای ۵ و ۱۵ کمتر و در روزهای ۲۱ و ۲۸ دوره پروش بیشتر از گروه دیگر بود. تناوب در میزان جداسازی باکتری سالمونلا در مطالعات مختلف مشاهده می‌شود. مشابه مطالعات فوق، Ribiro و همکاران در سال ۲۰۰۵، در پژوهشی بر روی جوجه‌های گوشتی نشان دادند که باکتری سالمونلا در روز ۱۵ پس از تلقیح از سکوم گروهی که مقدار باکتری کمتری دریافت کرده بودند بیشتر جدا شد لیکن میزان جداسازی در روز ۴۲ پس از تلقیح کمتر از گروه دیگر بود.

Asheg و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ای نشان دادند که پاک‌سازی باکتری از بافت‌های گروهی که میزان باکتری کمتری دریافت کرده بودند، سریع‌تر بود و باکتری از سکوم و کبد این گروه در روزهای ۲۱ و ۲۷ پس از تلقیح جدا نشد؛ درحالی‌که در گروهی که مقدار باکتری بیشتری دریافت کرده بودند در تمام نمونه‌های سکومی و ۸۰ درصد نمونه‌های کبدی در ۶ ساعت پس از تلقیح و در سکوم و کبد در تمام طول دوره باکتری جدا شد (۱).

از کبد جوجه‌های گروه یک (۱۷۰CFU) تعداد باکتری بیشتری در طی روزهای ۲، ۴، ۷ و ۲۱ جدا شد. مشاهده نمودارهای مربوط به پژوهش حاضر نشان می‌دهد که طی روزهای اول دوره پرورش، تعداد سالمونلای جدا شده از بافت‌های مختلف پرنده‌های گروه یک (۱۷۰CFU) بالاتر از گروه دیگر بود، سپس تا اندازه‌ای این میزان کاهش پیدا کرد و در روزهای آخر دوره پرورش به میزان بیشتری جدا شده است. در پژوهش حاضر، همانند پژوهش‌های یاد شده باوجود آلودگی تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار با مقادیر متفاوت باکتری سالمونلا و انتقال عمودی آن، تناوب در میزان جداسازی باکتری از ارگان‌های مختلف دو گروه در طی روزهای مختلف دوره پرورش مشاهده شد. دفع مدفوعی و میزان جداسازی باکتری سالمونلا از بافت‌های مختلف جوجه‌هایی که میزان بالاتری باکتری سالمونلا به تخم‌مرغ نطفه‌دار آن‌ها تلقیح شده بود، بیشتر از گروه دیگر بود. این مطلب بیانگر این مطلب است که هر چه تعداد باکتری‌های سالمونلا در تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار بیشتر باشد، میزان آلودگی اندام‌های داخلی جوجه‌های هچ شده بیشتر خواهد بود و دفع مدفوعی بیشتری خواهند داشت. دفع متناوب باکتری سالمونلا در پژوهش‌های دیگر ثابت شده و

www.SID.ir

Archive of SID

میزان متفاوتی از باکتری سالمونلا در روزهای مختلف پس از تلقیح دفع می‌شود (۸ و ۹)، در پژوهش حاضر میزان دفع باکتری سالمونلا در گروهی که باکتری بیشتری تلقیح شده بود همواره بالاتر بود. از سوی دیگر، طی این مطالعه چون روش انتخاب تلقیح تجربی باکتری در تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار -روشی مشابه انتقال عمودی باکتری در فارم- انتخاب شد امکان بررسی انتقال عمودی آلودگی به‌صورت کنترل‌شده و تجربی فراهم گردید.

منابع

1- Asheg, A A; Fedorova, V; Pistl, J; Levkut, M; Revajova, V; Kolodzieyski, L; Ševčiková, Z and Pilipčinec, E. Effect of low and high doses ofSalmonella enteritidis PT4 on experimentally infected chicks. Folia. Microbiol. 2004; 46: 459-462.

2- Cardoso, W M; Albuquerque, Á H; Teixeira, RSC; Lopes, E S; Sales, RJPF, Horn, RV; Rocha-e-Silva, RC; Bezerra, W G A, and Gomes-Filho, VJR. Dissemination of Salmonella enteritidis by experimentally-infected pigeons. Rev. Bras. Ciênci Avíc. 2013; 15: 211–215.

3- Davies, R and Mark, B. Observations on Salmonella contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for Salmonella enterica serovar Enteritidis had been used. Avian. Pathol. 2004; 33: 133–44.

4- Desmidt, M; Richard, D; Freddy, H; Groot, PADe; Verlinden, M; Wijffels, R; Hinton, M; Bale, J A, and Allen, VM. Detection of antibodies to Salmonella enteritidis in sera and yolks from experimentally and naturally infected chickens. Vet. Rec. 1996. 138: 223–226.

5- Finlay, B, and Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev. 1989. 53: 210–30.

6- Gantois, I; Richard D; Frank, P; Freddy, H; Richard, G; Tom, JH and Filip VI. Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. FEMS. Microbiol. Rev. 2009. 33: 718–38.

7- Gast, Richard K, and C W Beard. Production of Salmonella enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. Avian dis.1990; 34: 438–446.

8- Gast, R. K and Beard, C.W. Evaluation of a chick mortality model for predicting the consequences of Salmonella enteritidis infections in laying hens. Poultry. Sci 1992; 71: 281–287.

9- Gast, R. K, and Peter, S.H. Persistence of Salmonella enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. Poultry. Sci. 1998; 77: 1759–1762.

10- Gast, R.K; Rupa, G and Peter S. H. Frequency and Persistence of Fecal Shedding Following Exposure of Laying Hens to Different Oral Doses of Salmonella enteritidis. Int. J. Poultry. Sci. 2011; 10: 750–756.

www.SID.ir

Archive of SID

Mendonça, A. O and Ferrati, A. R. Experimental infection by Salmonella enterica subsp enterica serovar kottbus in day-old broiler chickens. Rev. Bras. Ciênci. Avíc. 2005; 7: 107–112.

18- Ward, L and Rowe, B. Salmonella enteritidis phage type 4 infection: association with hens' eggs. Lance.; 1988; 2: 1295-1297.

11- Guard-petter, J. Minireview The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. Environ. Microbiol. 2001; 3: 421-430.

12- Lahuerta, a; Helwigh, B and Mäkelä, P. Zoonoses in Europe: distribution and trends - the EFSA-ECDC Community Summary Report 2008. EAAP Comm. Dis. bull. 2010. 15: 19476.

13- Madadi, M. S; Azari M; Yazdani, A and Shekarchi, A.A. Evaluation of different plating medias and PCR in the detecting of Salmonella Enteritidis from eggs laid by experimentally infected hens. J. AniM. Poultry Sci. 2012; 1: 13–23.

14- Madadi, M.s M.S; Mohammad H; Gholamreza, N; Mohammad, H. B and Hamid, S. A comparative study on the colonization of Salmonella enteritidis hilA mutant and its parent strains in laying hens. Iran. J. Vet. Med. 2012; 6: 227–233.

15- Okamura, M; Yuka, K; Tadashi, M; Hiroyuki, T; Kazumi, S and Eiichiroh, B. Differences among six Salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. Avian. dis. 2001; 45: 61–69.

16- Pan, T. M and Yi-J. L. Identification of Salmonella enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2002; 35: 147-151.

17- Ribeiro, S. A. M, Berchieri, Orsi, M.A;

www.SID.ir

Archive of SID

Experimental vertical transmission of different doses of *Salmonella Enteritidis* in Broilers chickens

Madadi, M.S.[1*]; Yousefi, K.[2]

1. Assistant professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.
2. DVM Graduated Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

Recieved: 21 October 2014 ***Accepted:*** 21 July 2015

Summary

Salmonellosis is one of the most important food-borne diseases. Outbreaks of Salmonellosis are related to the consumption of contaminated eggs, egg-products or poultry meat. Salmonella has the unique ability to contaminate eggs without causing discernible illness in the birds infected. In this study, two groups of fertile eggs were inoculated with 170 (A) and 17 (B) CFU of parent strains of *S. Enteritidis* (S.E). Contaminated eggs were incubated in different setters and survived chickens were hatched. At days 2, 7, 14, 21 and 28 of rearing period, samples were taken from cloaca and different parts of digestive system of euthanized birds. High rate of Salmonella contamination were observed in cloacal swabs of group A eggs; Salmonella contamination of caecum, intestines and livers of group A chickens in early and late days of experimental period were more higher than group B chickens. Using PCR test, four genes for S. Enteritidis identification were detected from isolated colonies of two group eggs and chickens.

Keywords: *Salmonella Enteritidis*, Fertile eggs, Broilers, PCR.

* Corresponding Author email: madadi@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir