

## Prevalence and Comparison of *Salmonella* Serotypes in Indigenous and Industrial Chicken Eggs Collected from Khorramabad Using Culture and PCR Methods

Azar Doulat<sup>1</sup>, Mohammad Reza Mahzounieh<sup>1</sup>, Nemat Shams<sup>2</sup>, Lida Etemdfar<sup>2</sup>

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2017/08/26

Accepted: 2018/05/16

Available online: 2018/06/30

#### Article Subject:

Clinical Microbiology

IJMM 2018; 12(2): 88-95

#### Corresponding author:

Lida Etemdfar  
MSc of Bacteriology,  
Department of Pathobiology,  
Faculty of Veterinary  
Medicine, Lorestan University,  
Khorramabad, Iran

Tel: 09168424930

#### Email:

Lida.etemdfar@yahoo.com

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** Foodborne diseases are one of the major health and economic problems in industrialized and non-industrialized countries. *Salmonella* serotypes have been considered as one of the most important foodborne pathogens around the world. Poultry and eggs are considered as major sources for different pathogenic *Salmonella* serotypes. The aim of this study was to investigate prevalence of *Salmonella* contamination in indigenous and industrial chicken eggs in Khorramabad during 2015-2016.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study, a total of 360 (180 indigenous and 180 industrial) eggs were collected from different part of Khorramabad area. The eggs were immediately transferred to microbiology laboratory in aseptic conditions. In order to determine *Salmonella*, after culture according to the reference conventional methods, the suspected colonies were confirmed using Serotyping and PCR

**Results:** The results showed that two samples of 180 indigenous eggs (1.1%) were contaminated to *salmonella*, but there was no contamination in industrial eggs.

**Conclusions:** The findings of the current study indicated that although *Salmonella* was not found in industrial egg samples but indigenous eggs produced in small farms may be harmful to consumers and cause the spread of *salmonella* contaminations in the environment.

**Keywords:** Prevalence, *Salmonella*, contamination, Eggs, PCR

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Doulat A, Mahzounieh M R, Shams N, Etemadfar L. Prevalence and Comparison of *Salmonella* Serotypes in Indigenous and Industrial Chicken Eggs Collected from Khorramabad Using Culture and PCR Methods. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (2): 88-95



## بررسی شیوع و مقایسه سروتیپ‌های سالمونلا در نمونه تخم‌مرغ‌های طیور بومی و صنعتی شهرستان خرم‌آباد با استفاده از کشت و PCR

آذر دولت<sup>۱</sup>، محمدرضا محزونیه<sup>۱</sup>، نعمت شمس<sup>۲</sup>، لیدا اعتمادفر<sup>۲</sup>

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: بیماری‌های منتقل‌شونده از طریق غذا، یکی از مشکلات اصلی بهداشتی و اقتصادی بین کشورهای صنعتی و غیرصنعتی هستند. سروتیپ‌های سالمونلا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذا زاد در سراسر دنیا در نظر گرفته شده‌اند. طیور و تخم‌مرغ منابع اصلی برای سروتیپ‌های مختلف بیماری‌زای سالمونلا در نظر گرفته می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع آلودگی سالمونلایی در تخم‌مرغ‌های بومی و صنعتی در خرم‌آباد طی سال ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۶ بود.

مواد و روش‌کار: در این مطالعه مقطعی - توصیفی، در مجموع ۳۶۰ تخم‌مرغ (۱۸۰ بومی و ۱۸۰ صنعتی) از نواحی مختلف خرم‌آباد جمع‌آوری شد. تخم‌مرغ‌ها بلافاصله تحت شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. به‌منظور تعیین آلودگی سالمونلایی، پس از کشت بر اساس روش‌های متداول مرجع، پرگنه‌های مشکوک با استفاده از سروتایپینگ و PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج حاکی از آن بود که ۲ نمونه از ۱۸۰ نمونه تخم‌مرغ بومی (۱/۱ درصد) با استفاده از تکنیک PCR آلودگی سالمونلایی داشتند؛ اما هیچ‌گونه آلودگی در تخم‌مرغ‌های صنعتی وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد اگرچه سالمونلا در تخم‌مرغ‌های صنعتی یافت نشد، اما تخم‌مرغ‌های بومی تولیدشده در مزارع کوچک ممکن است برای مصرف‌کنندگان خطرناک باشند و باعث گسترش سالمونلا در محیط شوند.

کلمات کلیدی: شیوع، سالمونلا، آلودگی، تخم‌مرغ، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴  
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۶  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹  
موضوع:

میکروبی شناسی بالینی

IJMM1397;12(2): 88-95

نویسنده مسئول:

لیدا اعتمادفر

کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، گروه  
پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،  
دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تلفن: ۰۹۱۶۸۴۲۴۹۳۰

پست الکترونیک:

Lida.etemadfar@yahoo.com



### مقدمه

معمول به شکل گاستروانتریت حاد ظاهر می‌شود. کودکان، افراد بالای ۶۵ سال و کسانی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند، بیشتر در معرض خطر ابتلا قرار دارند و تظاهرات بیماری به صورت جدی‌تر از جمله سپتیمی، عفونت مغز و مرگ بروز می‌کند. سالمونلا از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا در سراسر جهان در نظر گرفته شده است. سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم و سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس از جمله

سالمونلاها باکتری متحرک، گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری متعلق به خانواده انتروباکتریاسه هستند. براساس جدول کافمن - وایت این جنس بیش از ۲۵۰۰ سرووار (سروتیپ) دارد. سرووارهای مختلف این باکتری در بسیاری از حیوانات از جمله گاو، خوک، اسب، پستانداران، خزندگان، دوزیستان و طیور (مرغ، اردک، غاز، بوقلمون) یافت می‌شوند. عفونت سالمونلا طی ۱۲ الی ۷۲ ساعت پس از قرارگیری در معرض آلودگی باکتریایی به‌طور

آلبومین به داخل سیتوپلاسم باکتری می‌شود. پوسته تخم‌مرغ سالم که شامل پوست، غشای پوسته و لایه ضخیم از موادی است که غشای پوسته را از آلبومین جدا می‌کند، به‌طور فیزیکی از نفوذ باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (۸).

به‌طور کلی دو راه برای آلودگی تخم‌مرغ به سالمونلا وجود دارد. تخم‌مرغ‌ها می‌توانند از طریق نفوذ باکتری به پوسته تخم‌مرغ از روده یا مدفوع آلوده طی یا پس از زمان تخم‌گذاری آلوده شوند (انتقال افقی). مسیر دوم آلودگی مستقیم زرده، سفیده، غشای پوسته و یا پوسته تخم‌مرغ قبل از تخم‌گذاری است که منشأ آن آلودگی اندام‌های تناسلی به سالمونلا است (انتقال عمودی) (۱). با توجه به اینکه مرغ‌های محلی اکثراً در شرایط غیربهداشتی و غیرصنعتی پرورش می‌یابند و کنترلی هم بر تغذیه آنها اعمال نمی‌شود، لذا تخم‌مرغ‌های حاصله می‌توانند حاوی آلودگی سالمونلایی بیشتری باشند. نظر به اهمیت سالمونلوزیس مرغ و تخم‌مرغ در ایجاد مسمومیت غذایی انسان، هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع سروارهای مختلف سالمونلا در نمونه تخم‌مرغ‌های بومی و صنعتی شهرستان خرم‌آباد است.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع‌آوری نمونه

این مطالعه به‌صورت مقطعی - توصیفی طی سال ۱۳۹۴ در دوره زمانی ۶ ماهه (فصل پاییز و زمستان) انجام پذیرفت که در مجموع تعداد ۱۸۰ عدد تخم‌مرغ بومی از بازار و نقاط مختلف شهر خرم‌آباد و ۱۸۰ عدد تخم‌مرغ نیز از تنها مرغداری تخم‌گذار صنعتی فعال در خرم‌آباد جمع‌آوری شده و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال یافتند.

##### کشت و جداسازی

برای مرحله پیش‌غنی‌سازی تحت شرایط استریل با کشیدن سوآب آغشته به سرم فیزیولوژی روی پوسته تخم‌مرغ‌ها، از آنها نمونه تهیه و در محیط لاکتوز برات (تمامی محیط‌های کشت ساخت شرکت QUELAB, Germany) با حجم ۵ میلی‌لیتر کشت داده شد. به‌منظور نمونه‌برداری از زرده و سفیده، تخم‌مرغ‌ها به‌صورت جداگانه به‌منظور ضدعفونی سطح در داخل ظرف استریل حاوی الکل ۷۰ درصد (Merck, Germany) به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند به نحوی که آسیبی به پوسته آن وارد نشود. پس از خروج تخم‌مرغ‌ها از الکل، پوسته آهکی تخم‌مرغ شکسته شده و زرده و سفیده در ظروف استریل از یکدیگر جدا شدند و مقدار ۱/۵ سی‌سی از زرده هموزن شده برداشته و به محیط لاکتوز برات با

سروارهایی‌اند که اغلب از بیماری‌های ناشی از موادغذایی جدا شده‌اند و شیوع گسترده‌ای در آسیا (کره، ژاپن و تایلند) دارند (۱،۲،۳). در بیشتر کشورهای اروپایی سالمونلا انتریکا دومین عامل عفونت‌های گوارشی باکتریایی شناخته شده است (۴).

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. طیور یکی از منابع مهم انتقال سالمونلا هستند و ابتلای انسان به‌دنبال مصرف گوشت و تخم‌مرغ آلوده رخ می‌دهد (۴، ۵). لذا کنترل عفونت‌های سالمونلا برای سلامت طیور و صنایع تبدیلی غذا حائز اهمیت است. همچنین معیارهای مؤثر کنترل و پیگیری برای کاهش آلودگی سالمونلا در طیور ضروری به‌نظر می‌رسد. علاوه بر اهمیت بهداشت عمومی، آلودگی تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار به سالمونلا می‌تواند از راه افزایش تلفات در دوران جنینی و بعد از تولد و همچنین کاهش راندمان تولید موجب زیان اقتصادی فراوان شود (۶). سالمونلا در مرغ سه نوع بیماری ایجاد می‌کند که عبارتند از: بیماری پلوروم که عامل آن سالمونلا پلوروم است؛ تیفوئید مرغی که عامل آن سالمونلا گالیناروم است؛ عفونت‌های پاراتیفوئیدی نشأت‌گرفته از سروارهای متعدد که باعث مسمومیت غذایی انسان می‌شوند مثل سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس (۷).

از وقوع سالمونلوزیس در انسان که منبع آن تخم‌مرغ‌های آلوده بوده است، به‌ویژه در مواردی که تخم‌مرغ خام یا نیم‌پز استفاده شده، گزارش‌های متعددی وجود دارد (۱). تخم‌مرغ ارزش غذایی بالایی دارد؛ چرا که تمام اسیدآمین‌های ضروری را در بر می‌گیرد و سرشار از ویتامین‌ها و موادمعدنی است. علاوه بر این تخم‌مرغ یک منبع پروتئینی ارزان است؛ بنابراین میزان استفاده فراوانی دارد (۴، ۸). زرده بستر مناسبی برای تکثیر باکتری‌ها در مقابل سایر اجزای تخم‌مرغ است؛ چراکه مکانیسمی برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها ندارد. علاوه بر این عفونت تخمدان‌ها باعث آلودگی سالمونلایی زرده از طریق نفوذ عفونت از پوسته تخم‌مرغ آلوده و غشای زرده می‌شود. زمان ذخیره‌سازی و دما بر میزان نفوذ به زرده مؤثر است. اما سفیده حاوی مواد ضد میکروبی است. در سفیده تخم‌مرغ غلظت بالای اووترانسفرین که از شلاتورهای آهن است، باعث مهار رشد باکتری‌ها می‌شود. همچنین لیزوزوم‌ها که پپتیدهای کاتیونی هستند قادر به اثرگذاری متقابل بر لیپوپلی‌ساکارید دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی هستند و باعث تشکیل منافذی می‌شوند که موجب نفوذ

اختصاصی سالمونلای تهیه شده از شرکت بهار افشان، طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

### استخراج DNA

برای استخراج DNA، پرگنه های مشکوک به سالمونلا در محیط لوریا برتانی آگار کشت داده شدند و سپس از روش Boiling برای استخراج استفاده شد (۹). بدین منظور مقداری از کلونی باکتری را در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط کرده، به طوری که کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند (معادل  $10^8 \times 1/5$  سلول) ایجاد شد. سپس میکروتیوبها در دمای  $100^\circ\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ صورت گرفت و مایع رویی تا زمان انجام آزمون PCR در فریزر  $-20^\circ\text{C}$  نگهداری شد.

### تشخیص جنس سالمونلا با آزمون PCR

به منظور انجام آزمون PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن *Inv* A (تهیه شده از سوی شرکت سیناژن) که کدکننده پروتئین غشای داخلی باکتری است و برای تهاجم باکتری به سلولهای اپیتلیال ضروری است، استفاده شد (۱۰). ردیف بازهای پرایمرها و اندازه محصول PCR در جدول ۱ ارائه شده است. در این بررسی از سویه استاندارد سالمونلاتیفی موریوم (*S. typhimurium* ATCC: 14028) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

حجم ۵ سی سی انتقال داده شد. برای سفیده نیز این مرحله انجام گرفت.

از یک تخم مرغ سه نمونه محیط لاکتوز براث حاوی زرده، سفیده و پوسته به دست آمد که به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  در انکوباتور نگهداری شد. در کل ۵۴۰ نمونه تخم مرغ صنعتی و ۵۴۰ نمونه تخم مرغ بومی در محیط لاکتوز براث پیش غنی سازی شد. به منظور غنی سازی از محیط سلنیت F و محیط تتراتیونات براث استفاده شد که میزان ۱ سی سی از محیط پیش غنی شده به ۹ سی سی از محیطهای مذکور افزوده شد. محیط سلنیت F در  $37^\circ\text{C}$  درجه و محیط تتراتیونات براث در دمای  $42^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. در ادامه یک لوپ از هر کدام از محیطهای غنی شده به طور جداگانه بر محیطهای افتراقی مکانکی آگار، هکتون انتریک آگار، SS و XLD کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شد. برای تأیید کلونیهای مشکوک به سالمونلا آزمایشات بیوشیمیایی از جمله کشت در سیمون سترات، اوره آگار (Merck, Germany)، TSI و MR-VP (Merck, Germany) انجام پذیرفت.

### سروتایپینگ

برای تعیین گروه سرمی از کشت ۲۴ ساعته و خالص باکتری در محیط TSI با استفاده از آنتی سرمهای اختصاصی استفاده شد. به منظور آزمایش سرمی آگلوتیناسیون روی لام، از کیت سرمی

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی ژن *Inv A*

مرجع	طول محصول (bp)	ژن هدف	توالی پرایمر	پرایمر
۱۰	۲۸۴	<i>Inv A</i>	۵'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-۳'	S139-F
			۵'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-۳'	S141-R

برای تعیین سرووارهای سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پلوروم با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز از پرایمرهای اختصاصی هر یک از سرووارها استفاده شد (جدول ۳). در رابطه با پرایمرهای استفاده شده برای سرووارهای سالمونلا پلوروم و سالمونلا گالیناروم، پرایمر طراحی شده کدکننده بخشی از ژن *ratA* است که محصول آن برای سالمونلا گالیناروم ۱۰۴۷ bp و برای سالمونلا پلوروم ۲۴۳ bp است و می تواند دو سرووار بررسی شده را از هم افتراق دهد.

برای انجام PCR،  $12/5$  میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon C, Denmark)، ۲ میکرولیتر DNA نمونه مشکوک و یک میکرومول از پرایمرهای S139 و S141 با غلظت ۱۰ پیکومول استفاده شد و سپس با آب دیونیزه حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه زمانی و دمایی ترمال سایکلر (Primus 96, Germany) مطابق با جدول شماره ۲ انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR از سوی دستگاه الکتروفورز (Padideh Nojen Pars, Iran) بر ژل آگاروز ۱٪ (Sigma, USA) و با استفاده از رنگ Safe Stain (SinaClon, Iran) انجام شد. ژلها با استفاده از دستگاه ژل داک (Syngene, England) بررسی شدند.

جدول ۲. سیکل‌های حرارتی به‌منظور تکثیر ژن *Inv A*

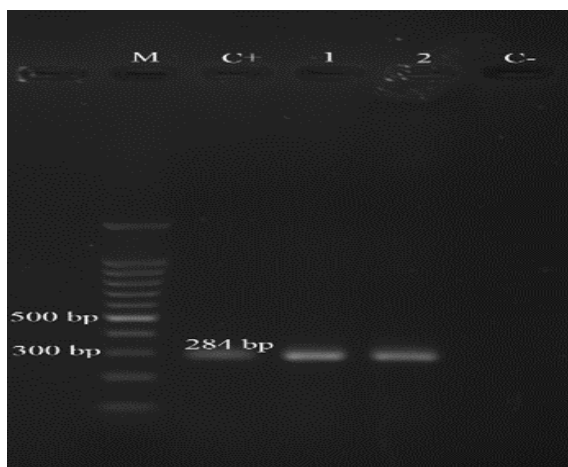
مراحل	درجه حرارت (°C)	زمان
Initial denaturation	۹۵	۵ دقیقه
Denaturation	۹۵	۴۵ ثانیه
Annealing	۵۶	۴۵ ثانیه
Extension	۷۲	۴۵ ثانیه
Final extension	۷۲	۷ دقیقه
Cycle number		۳۰

جدول ۳. توالی پرایمرهای استفاده‌شده به‌منظور شناسایی سرووارهای سالمونلا

سرو تیپ	پرایمر	توالی پرایمر (5'→3')	ژن هدف	طول محصول (bp)	مرجع
سالمونلا تیفی موریوم	Flic-s	ATAGCCATCTTTACCAGTTCCCC	<i>fliC</i>	۱۸۳	۱۱
	Flic-as	GCTGCAACTGTTACAGGAATATGCC			
سالمونلا انتریتیدیس	SefA2	GCAGCGGTTACTATTGCAGC	<i>SefA</i>	۳۱۰	۱۲
	SefA4	TGTGACAGGGACATTTAGCG			
سالمونلا گالیناروم	ratA Forward	GACGTCGCTGCCGTCGTACC	<i>ratA</i>	۱۰۴۷	۱۳
سالمونلا پلوروم	ratA reverse	TACAGCGAACATGCGGGCGG			

#### یافته‌ها

سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پلوروم صورت گرفت که هیچ‌یک از سرووارهای مدنظر مشاهده نشد.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *Inv A* به منظور شناسایی جنس سالمونلا. M: مارکر ۱۰۰bp، ستون‌های ۱ و ۲: نمونه‌های مثبت، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی

از مجموع ۱۸۰ نمونه تخم‌مرغ بومی، ۱۸ عدد لاکتوز منفی بودند؛ اما از ۱۸۰ نمونه تخم‌مرغ صنعتی، نمونه لاکتوز منفی جدا نشد. در ۱۸ نمونه لاکتوز منفی، با ارزیابی‌های صورت‌گرفته از طریق تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های کشت افتراقی هیچ پرگنه مشکوک به سالمونلایی مشاهده نشد. همچنین نتایج سروتایپینگ با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان گروه‌های A، B، C و D (آنتی‌سرم‌های پلی‌والان O شرکت بهارافشان، ایران) منفی بود. اما پس از بررسی با آنتی-سرم‌های O مونووالان تهیه‌شده از شرکت mast (mastassure, UK) دو نمونه سالمونلا نیواینگتون تشخیص داده شد. در آزمون PCR که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *invA* برای تعیین جنس سالمونلا انجام گرفت، از ۱۸ نمونه لاکتوز منفی ۲ نمونه (یک زرده و یک سفیده) مثبت شدند (جدول ۴) که برای آنها باند ۲۸۴ bp قابل مشاهده بود (شکل ۱). درباره دو نمونه مثبت آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به‌منظور شناسایی سرووارهای سالمونلا / انتریتیدیس،

جدول ۴. میزان آلودگی سلمونلایی تخم‌مرغ‌های بومی با استفاده از PCR

نوع نمونه	تعداد نمونه (تخم‌مرغ بومی)	موارد مثبت	درصد آلودگی
پوسته تخم‌مرغ	۱۸۰	۰	۰
زرده تخم‌مرغ		۱	۰/۵
سفیده تخم‌مرغ		۱	۰/۵
مجموع		۲	۱/۱



## بحث

بررسی‌های انجام‌گرفته در مناطق مختلف ایران نشان داده است که شایع‌ترین سرووارهای جداشده *سالمونلا* از تخم‌مرغ‌های آلوده، *سالمونلا آنتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی* موریوم هستند (۵، ۳). در رابطه با آلودگی *سالمونلایی* تخم‌مرغ گزارشات نشان می‌دهد که در اسپانیا ۱ درصد، لهستان ۵ درصد، انگلستان ۷ درصد و هند ۱/۸ درصد آلودگی وجود دارد (۱۵). در ایران نتایج مطالعه Mozaffari و همکاران (۱۳۹۲) به‌منظور بررسی آلودگی تخم‌مرغ‌های محلی و صنعتی به *سالمونلا* در تالش، نشان داد که ۱۹ درصد پوسته تخم‌مرغ‌های صنعتی و ۴ درصد پوسته تخم‌مرغ‌های محلی آلوده به *سالمونلا* Id هستند (۱۶) که با مطالعه حاضر به‌دلیل جدانشدن *سالمونلا* از پوسته مطابقت ندارد؛ هرچند که جدایه‌های لاکتوز منفی از پوسته استخراج شد. جدانشدن *سالمونلا* از پوسته تخم‌مرغ‌ها ممکن است به‌دلیل نبود آلودگی *سالمونلایی* در این منطقه و یا آلودگی با فراوانی اندک باشد که با این تعداد نمونه قابل شناسایی نبوده است. همچنین افراد به‌منظور بازاری‌پسندی تخم‌مرغ‌های بومی اقدام به شستشوی تخم‌مرغ‌ها می‌کنند که خود باعث پایین آمدن بار میکروبی بر پوسته تخم‌مرغ می‌شود.

همچنین در مطالعه دیگری که از سوی Monadi و همکاران (۱۳۹۳)، برای تعیین آلودگی *سالمونلایی* تخم‌مرغ‌های بومی استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از تکنیک PCR صورت گرفت، ۶/۶ درصد آلودگی به *سالمونلا* گزارش شد که ۳/۳۳ درصد آلودگی آن مربوط به پوسته و ۳/۳۳ درصد آلودگی مرتبط با زرده تخم‌مرغ‌ها بود (۱۷). این نتایج اندکی با مطالعه حاضر احتمالاً به‌دلیل استفاده از تکنیک آزمایشگاهی مشابه و نزدیکی جغرافیایی مطابقت دارد. مطالعه‌ای از سوی Esmaeili و همکاران (۱۳۹۳) به‌منظور تعیین سرووارهای *سالمونلا* در تخم‌مرغ‌های بومی استان گیلان با استفاده از کشت و خصوصیات بیوشیمیایی و سروتایپینگ انجام گرفته است که براساس آن آلودگی یک نمونه از پوسته و سه نمونه از محتویات تخم‌مرغ‌ها به *سالمونلا* گزارش شد. *سالمونلا*های جداشده متعلق به گروه سرمی C و D جدول کافمن - وایت بودند (۴).

در مطالعه‌ای که از سوی Moosavy و همکاران (۲۰۱۴) برای جستجوی جنس *سالمونلا* در تخم‌مرغ‌های تجاری شهر تبریز انجام پذیرفت، ۱/۳۳ درصد از پوسته تخم‌مرغ‌ها آلودگی به جنس *سالمونلا* داشتند که سرووار آنتریتیدیس و تیفی موریوم بودند (۱).

البته نتایج آنها با مطالعه ما همخوانی ندارد؛ زیرا در بررسی حاضر، باکتری *سالمونلا* از تخم‌مرغ‌های تجاری جدا نشد که این امر احتمالاً به‌دلیل رعایت اصول بهداشتی است. در مطالعه‌ای دیگر که از سوی Zubair و همکاران (۲۰۱۷) با عنوان شیوع *سالمونلا* در تخم‌مرغ در داهوک با استفاده از کشت انجام شد، نتایج نشان داد که ۴/۸۵ درصد از پوسته تخم‌مرغ‌ها به جنس *سالمونلا* آلوده هستند (۱۴).

آلودگی پوسته تخم‌مرغ می‌تواند به‌علت رسوب مواد مدفوعی روی پوسته، انتقال از جعبه تخم‌مرغ و یا لباس و دست کارگران، هنگام بسته‌بندی و ذخیره‌سازی، گردوغبار، محیط زیست، شرایط آب‌وهوایی و یا در حین حمل‌ونقل صورت پذیرد (۱۵). همچنین آلودگی پوسته می‌تواند در اثر مرطوب بودن پوسته، نگهداری در دمای محیط و در حین شکستن تخم‌مرغ به محتویات آن منتقل شود و باعث بروز مسمومیت غذایی در انسان شود (۴، ۱۸). البته باکتری به‌طور مستقیم می‌تواند از تخمدان باعث آلودگی محتویات تخم‌مرغ شود.

طی بررسی‌ای که از سوی Fardows و همکاران (۲۰۱۵)، به‌منظور شناسایی باکتری‌های هوازی بیماری‌زا از پوسته تخم‌مرغ و محتویات آن انجام گرفت، آلوده بودن به جنس *سالمونلای* ۶/۶۷ درصد از پوسته تخم‌مرغ‌ها با استفاده از کشت میکروبی روشن شد؛ در صورتی که هیچ‌کدام از محتویات تخم‌مرغ‌ها با استفاده از کشت به‌منظور تشخیص آلودگی مثبت نبودند. اما با استفاده از تکنیک PCR، ۷ نمونه از محتویات تخم‌مرغ‌ها و ۱۴ نمونه از پوسته تخم‌مرغ‌ها مثبت شدند که با مطالعه حاضر به‌دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی و روش بررسی همخوانی ندارد (۱۹). Moraes و همکاران (۲۰۱۶) که مطالعه‌ای به‌منظور بررسی جنس *سالمونلا* در تخم‌مرغ‌های تجاری سفید و قهوه‌ای شسته‌شده و شسته‌نشده با استفاده از کشت و qPCR در برزیل انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که در مجموع ۵/۴ درصد از نمونه‌ها با استفاده از آنالیز باکتریولوژی و ۱۶ درصد با استفاده از تکنیک qPCR برای جنس *سالمونلا* مثبت هستند. در این بررسی تکنیک به‌کاررفته در آزمون و روش بررسی با مطالعه ما همخوانی ندارد (۸).

در مطالعه Loongyai و همکاران (۲۰۱۱) که به‌منظور تشخیص *سالمونلا* در نمونه‌های تخم‌مرغی که از سیستم‌های مختلف نگهداری مرغ تخم‌گذار جمع‌آوری شده بودند، انجام پذیرفت، با استفاده از روش‌های معمول باکتری‌شناسی و آزمون

تماس بوده نیز می‌تواند باعث آلودگی پوسته شود، اما آلودگی سالمونلایی سطح مرطوب تخم مرغ در زمان خروج از کلوک و تا قبل از خشک شدن در بستر می‌تواند به تثبیت آلودگی در پوسته بینجامد. بنابراین برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی سالمونلا باید درباره طيور بومی به منظور کاهش خطرات انتقال این باکتری انجام شود. با توجه به اینکه طيور سالم می‌توانند همواره باکتری سالمونلا را دفع کنند برای جلوگیری از شیوع بیماری آگاهی دادن به عموم مردم به ویژه روستاییان در رابطه با آلودگی سالمونلایی طيور، شستن دست‌ها پس از تماس مستقیم با طيور و پخت کامل تخم مرغ برای جلوگیری از بیماری کمک‌کننده هستند.

### نتیجه‌گیری

هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع سروارهای سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پلوروم در تخم مرغ‌های طيور بومی و صنعتی شهرستان خرم آباد با استفاده از کشت و PCR بود. دو سویه جدایه شده در این مطالعه با آنتی‌سرم‌های پلی‌والان گروه‌های A، B، C و D قابل شناسایی نبودند. هرچند تعلق آنها به جنس سالمونلا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین جنس از طریق آزمون PCR به اثبات رسید. جدایه‌ها پس از تعیین سرووار به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شد و در نهایت با استفاده از آنتی‌سرم‌های O مونووالان به‌عنوان سالمونلا نیواینگتون تشخیص داده شدند.

### سپاسگزاری

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد است؛ لذا نویسندگان از مساعدت و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان و از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌کنند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

PCR نشان داده شد که ۵ درصد از پوسته تخم مرغ‌ها به جنس سالمونلا آلوده هستند (۲۰). این مطالعات نشان می‌دهند که بین روش‌های تشخیصی، روش PCR به دلیل حساسیت و سرعت بالا، ابزاری مناسب و کارآمد برای تشخیص مواد غذایی آلوده به سالمونلا است؛ چراکه قادر به تشخیص مقدار اندک DNA در نمونه است. با توجه به مطالعه Bayhan oktem (۲۰۰۹) که در آنکارا به منظور شناسایی جنس سالمونلا در تخم مرغ و بررسی حیات باکتری در دمای یخچال و جوش صورت گرفت، ۶ درصد از نمونه‌ها آلوده به سالمونلا انتریتیدیس بودند. نتایج آنها نشان داد که با جوشاندن تخم مرغ به مدت ۸ دقیقه و پس از آن نگهداری در یخچال تا ۲۱ روز دیگر هیچ آلودگی سالمونلایی مشاهده نمی‌شود (۲۱). بنابراین می‌توان با نگهداری تخم مرغ در دمای یخچال رشد و تکثیر سالمونلا را به تأخیر انداخت. همچنین حرارت دادن تخم مرغ حداقل در دمای ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه روش مناسبی برای جلوگیری از انتقال آلودگی است.

به‌طور کلی در خصوص مرغداری‌های تخم‌گذار صنعتی، نبودن آلودگی قابل پیش‌بینی بود؛ زیرا مزارع تخم‌گذار تجارتي و مزارع مادر تخم‌گذار و کارخانه‌های جوجه‌کشی تحت کنترل سازمان دامپزشکی هستند و تحت شرایط قرنطینه‌ای و آزمایشات دوره‌ای همچون آزمایشات ارگانولپتیک/ظاهری (پوسته خارجی تمیز، عاری از هرگونه آلودگی، ترک‌خوردگی و شکستگی و محتویات عاری از هرگونه بوی خارجی و گندیدگی یا علائم فساد) و آزمایشات میکروبی قرار دارند و با توجه به سیستم پرورش قفس که در این مزارع استفاده می‌شود، آلوده شدن تخم مرغ از بستر به حداقل می‌رسد.

اما در تخم مرغ‌های بومی وجود آلودگی دور از انتظار نبود که این امر ممکن است به دلیل آلودگی مرغان بومی با منشأ کلوک یا بستر آلوده باشد. اگرچه سبدهای حمل تخم مرغ، انسان آلوده و هرگونه عامل محیطی آلوده به سالمونلا که تخم مرغ با آن در

## References

1. Moosavy MH, Esmaeili S, Bagheri Amiri F, Mostafavi E, Zahraei Salehi T. Detection of *Salmonella spp* in commercial eggs in Iran. Iran J Microbiol. 2015;7(1):50-4. PMID:26644874 PMID:PMC4670468
2. Basler C, Nguyen TA, Anderson TC, Hancock T, Behravesh CB. Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Associated with Live Poultry, United States, 1990–2014. Emerging Infect Dis. 2016;22(10):1705-11. <https://doi.org/10.3201/eid2210.150765> PMID:27649489 PMID:PMC5038410
3. Zahedi M, Rahimi E, Zahedi M, Momtaz H, Shojaii H. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* in marketed meat in Shahrekord in 2014. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017;19(2):88-97.
4. Esmaeili H, Hamed M, [Salmonella's Serotypes in Domestic Eggs in Gilan Province](#). Iran J Infect Dis

- Trop Med. 2014;19(65):39-45.  
<http://www.iiccom.org/JOURNAL/PDF/65/7.PDF>
5. Madadi MS, Yousefi K. Experimental vertical transmission of different doses of Salmonella Enteritidis in Broilers chickens. Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences. 2016;9(2):69-77.
  6. Jafari RA, Fazlara A, Dalirannia A, An investigation into Salmonella contamination of native hens' eggs in Ahvaz. Iranian Veterinary Journal. 2006;2(2):58-63.  
<http://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=93000>
  7. Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. Vet Microbiol. 2002;87(1):25-35.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00028-7)
  8. Moraes DMC, Duarte SC, Bastos TSA, Rezende CLG, Leandro NSM, Café MB, et al. Detection of Salmonella spp. by Conventional Bacteriology and by Quantitative Polymerase-Chain Reaction in Commercial Egg Structures. Rev Bras Cienc Avic. 2016;18(1):117-24.  
<https://doi.org/10.1590/18069061-2015-0063>
  9. Zahraei Salehi T, Tadjbakhsh H, Atashparvar N. Detection and identification of Salmonella Typhimurium in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic separation and multiplex PCR assay. Zoonoses Public Health. 2007;54(6-7):231-6.  
<https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01061.x>  
PMID:17803511
  10. Rahn K, De grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginoccho C, et al. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cell Probes. 1992;6(4):271-9.  
[https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-F](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-F)
  11. Lim YH, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Jpn J Infect Dis. 2003;56(4):151-5. PMID:14583637
  12. Pan TM, Liu YH. Identification of Salmonella Enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microb Immunol Infec. 2002;35(3):147-51. PMID: 12380786
  13. Lopes P, Neto OF, Batista D, Denadai J, Alarcon M, Almeida A, et al. Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum. Vet J. 2016;214:40-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.006> PMID:27387725
  14. Zubair AI, Al-Berfkani MI, Issa AR. Prevalence of Salmonella species from poultry eggs of local stores in Duhok. Int J Res Med Sci. 2017;5(6):2468-71.  
<https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20172430>
  15. Ghasemian Safaei H, Jalali M, Hosseini A, Narimani T, Sharifzadeh A, Raheimi E. The prevalence of bacterial contamination of table eggs from retail markets by Salmonella spp., Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni and Escherichia coli in Shahrekord, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(4):249-53.
  16. Mozaffari NA, Rahmani Z, Iesazadeh K. Evaluation of the level of contamination with Salmonella spp. In Red meat, Chicken, and Domestic and Industrial Eggs produced in Talesh City and assessment of their antibiotic resistance pattern, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2013;7(5):60-5.
  17. Monadi M, Kargar M, Naghiha A, Mohammadi R. Salmonella contamination of eggs of native Kohgiluyeh va Boyerahmad using PCR1 techniques and the evaluation of drug resistance. Armaghane Danesh. 2014;19(2):178-87. <http://armaghanej.yums.ac.ir/article-1-445-en.html>
  18. Amin Zare M, Nairiz naghade M, Rasoli S, Delshad R. Isolation of Salmonella spp. from local egg yolks in Urmia. Clinical Research of Large Livestock. 2009;7(3):51-5. <http://www.sid.ir/FileServer/JF/25713880708>
  19. Fardows J, Shamsuzzaman SM. Detection of potential pathogenic aerobic bacteria from egg shell and egg contents of hen collected from poultry. Bangladesh Med Res Counc Bull. 2015;41(2):67-72.  
<https://doi.org/10.3329/bmrcb.v41i2.29983>  
PMID:29624284
  20. Loongyai W, Wiriya B, Sangsawang N. Detection of Salmonella and Escherichia coli in Egg Shell and Egg Content from Different Housing Systems for Laying Hens. Int J Poult Sci. 2011;10(2):93-7.  
<https://doi.org/10.3923/ijps.2011.93.97>
  21. Bayhan oktem A, Kaynak onurdag F, Buket ER, Demirhan b. A research of salmonella spp. In egg and egg products and survival of salmonella in different temperatures. Turk J Pharm Sci. 2009;6(3):147-54.