

## بررسی میزان آلودگی سالمونلایی در جگر مرغ های جمع آوری شده در شهرستان ملایر

بهنام پدram<sup>۱</sup>، مسعود سلطانی الوار<sup>۱</sup>، لیلا درخشان<sup>۱</sup>، بیمان سپهری فرد<sup>۲</sup>، بردیا محمدی<sup>۳</sup>

۱- استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر.

۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر.

۳- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر.

### چکیده

**زمینه مطالعه:** سالمونلا یکی از بیماری‌های عفونی مهم و مشترک بین انسان و حیوانات است که به وسیله باکتری‌های جنس سالمونلا ایجاد می‌شود و سالانه موجب مرگ افراد زیادی از جمعیت‌های انسانی و دامی می‌گردد. در این میان گوشت مرغ آلوده به سالمونلا در درجه اول انتقال آلودگی قرار دارد. به همین دلیل شناسایی میزان فراوانی عفونت سالمونلا در گله‌های طیور اقدامی ضروری در اتخاذ اقدامات کنترلی مناسب در پیشگیری از انتقال آلودگی به جوامع انسانی محسوب می‌شود. با مطالعه بر روی منابع موجود مشخص گردید، اطلاعات به روزی در خصوص وضعیت سالمونلا و میزان آلودگی به این باکتری در گوشت و جگر مرغ و... در شهرستان ملایر وجود نداشته و لذا بررسی آلودگی جگر مرغ در این شهرستان مد نظر قرار گرفت. جهت انجام نمونه برداری به طور تصادفی از سطح سوپرمارکت های شهرستان ملایر ۱۰۰ عدد جگر مرغ خریداری شد سپس با هدف بررسی میزان آلودگی سالمونلایی به آزمایشگاه جهت انجام آزمایش های باکتریایی فرستاده شد. بعد از انجام آزمایش های باکتریایی به تعیین سروتیپ سالمونلا به استفاده از روش PCR پرداخته شد. در مطالعه حاضر مشخص گردید که ۲ درصد جگر مرغ های مورد مطالعه آلوده به باکتری سالمونلا بود. لازم به ذکر است که ۲ درصد نمونه ها دارای آلودگی باکتریایی بودند. همچنین مشخص گردید که سروتیپ غالب سالمونلا در جگرهای مرغ شهرستان ملایر سالمونلا آنترتیدیس است. با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که مواد غذایی با منشأ حیوانی، منابع مناسبی برای رشد سالمونلا در کشور به حساب می‌آید و توصیه می‌شود که جهت جلوگیری از آلودگی باکتریایی، اقدامات بهداشتی شدیدی برای جلوگیری از آلودگی آب و مواد غذایی انجام شود و همچنین سایر فرآورده های دامی باید به حد کافی پخته شوند.

**کلمات کلیدی:** سالمونلا، جگر مرغ، ملایر.

## مقدمه

درجه) و مرگ (در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت) همراه می باشد. آنتریت حاد (تورم روده حاد) شکل رایج بیماری در دام های بالغ تمام گونه های حیوانی است. و علائم آن شامل تب بالا، اسهال آبکی شدید، و گاهی اوقات اسهال خونی، دل درد و سقط می باشد. مدفوع بدبو و حاوی بلغم و خون است. میزان تلفات در این شکل بیماری ممکن است به ۷۵ درصد نیز برسد. آنتریت مزمن و آنتریت حاد شکل متداول بیماری در خوک و گاهی گاو و اسب است. این شکل بیماری در گوساله ها با اسهال متناوب و یا مداوم که حاوی رگه های خون است همراه می باشد.

سالمونلاها در پرندگان به دو طریق عمودی و افقی انتقال می یابند. در شکل عمودی که جوجه ها قبل از خروج از تخم آلوده می باشند، ناشی از آلودگی تخم به سالمونلاها است که منشأ آن میتواند تخمدان، اوبدوکت، کلواک، مدفوع بستر آلوده و یا شانه های حمل تخم باشد. در مورد سالمونلا پولوروم و گالیناروم که تمایل خاصی به تخمدان دارند انتقال عمودی اهمیت بیشتری از افقی دارد و عمدتاً در اثر آلودگی تخم در تخمدان صورت می گیرد. اما در سالمونلاهای پاراتیفوئید، انتقال افقی مهم تر است و انتقال عمودی آن نیز اغلب در اثر نفوذ باکتری از راه پوسته تخم متعاقب آلودگی پوسته در ناحیه کلواک یا بستر یا شانه های آلوده تخم است. بنابراین آسیب های مکانیکی که در هنگام بازرسی تخم به پوسته وارد می گردد و کیفیت ضعیف پوسته که خود ناشی از عوامل عفونی، تغذیه ای و

سالمونلا یکی از عوامل باکتریایی بیماریزای مشترک بین انسان و طیور است. از نظر بهداشت عمومی مسمومیت های غذایی ناشی از باکتری های گروه سالمونلا به علت تعدد سروتایپ ها میزبان های متفاوت و نیز نقش موثر ناقلین طبیعی شان (که البته کنترل آنها نیاز به وجود تشکیلات مبسوط و امکانات کافی دارد)، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. و با وجود تمامی اقدامات انجام شده و پیشرفت های بهداشتی همچنان به عنوان یک معضل جهانی محسوب می شود؛ لذا نتایجی که از محققان پیشین در این رابطه بدست آمده به شرح زیر است:

اولین مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا، در سال ۱۸۸۸ توسط Gartner در آلمان گزارش شد. با توجه به مطالعات انجام شده پرندگان بیش از سایر دام ها در انتقال سالمونلا دخالت دارند و اغلب سالمونلا های جدا شده از طیور برای انسان نیز بیماری زا هستند.

تمام سروتایپ های سالمونلا بالقوه میتوانند در حیوانات بیماری زا باشند و سبب عفونت های انفرادی و یا همه گیر شوند. اکثر سروتایپ هایی که از نمونه های درمانگاهی انسانی و حیوانات خونگرم جدا میگردند متعلق به تحت گونه هستند. در حیوانات سالمونلوز به صورت عمده سپتی سمی، آنتریت حاد، آنتریت مزمن مشاهده میگردد. سپتی سمی سالمونلایی به خصوص در مراحل اولیه واگیری، شکل شاخص سالمونلوز در کره اسب، گوساله، بره است که با بیحالی، گیجی، سستی، تب بالا (۴۰ تا ۴۲

برای تایید سروتایپینگ انجام شد. پس از خالص سازی باکتری در محیط کشت TSI به مدت ۲۴ ساعت، کلنی در محیط LB آگار با استفاده از آنتی سرم های اختصاصی (دیفکو، ایالات متحده آمریکا) کشت داده شد. آنتی سرم های O و H برای تعیین سروتایپ استفاده شد و نتایج طبق طرح کافمن وایت تفسیر شد.

کلونی مشکوک به سالمونلا که از طریق آزمایشات بیوشیمیایی مشخص گردید، انتخاب شدند و روی محیط LB قرار داده شد و ۲۴ ساعت بعد سروتایپینگ انجام داده شد.

به منظور انجام آزمایش PCR از پرایمرهای اختصاصی Inva (تهیه شده از شرکت سیناکولون) که کد کننده ی پروتئین غشای داخلی باکتری است و برای تهاجم باکتری به سلول های اپیتلیال ضروری است، استفاده شد ردیف بازها و محصول PCR در جدول ۱ ارائه شده است. در این بررسی از سویه ی استاندارد سالمونلا اینتریتیدیس به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

محیطی بوده میتواند موجب تشدید نفوذ این سالمونلاها شود.

از علائمی که توسط تمام سروتایپ های ایجاد کننده سالمونلا به وجود می آیند می توان به ضعف، خواب آلودگی، افتادگی بال ها، جمع شدن پرندگان نزدیک منبع حرارتی، کاهش رشد، کم آبی، اسهال، ضعیف و سست بودن، کاهش میزان جوجه آوری و افزایش تلفات در جوجه های تازه به دنیا آمده، کاهش وزن و کاهش میزان پر درآوری اشاره نمود. همچنین در فرم مزمن بیماری به علت جای گیر شدن باکتری در اتاقک قدامی چشم و مفصل درشت نی-مچ دستی، ممکن است کوری و تورم مفصل همراه با لنگش ایجاد گردد.

### مواد و روش کار

در ابتدا برای جمع آوری نمونه ها از چند نقطه شهرستان ملایر به طور تصافی جگر مرغ بسته بندی شده تهیه شد و نمونه گیری از آن ها انجام گرفت. سپس با هدف بررسی میزان آلودگی سالمونلایی به آزمایشگاه فرستاده شدند.

ابتدا هر نمونه به وسیله تیغ بیستوری هموژن شده، تا کل قسمت های جگر مخلوط شود و کشت داده شدند.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی ژن Inv A

پرایمر	توالی پرایمر (۳-۵)	زن هدف	طول محصول (bp)	مرجع
S139-F S141-R	GTGAAATFATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	Inv A	۲۸۴	میرزایی و همکاران، (۲۰۱۰)

این محیط یک محیط انتخابی برای جداسازی سالمونلا و شیگلا می باشد. در این محیط پرگنه‌های سالمونلا و شیگلا به رنگ قرمز دیده می شوند. سالمونلا هنگامی که گلوکز را تخمیر می کند حالت اسیدی به وجود می آورد و متعاقبا با رخ دادن دکربوکسیلاسیون لیزین حالت اسیدی خنثی می شود و محیط کاملا به رنگ قرمز (قلیایی) در می‌آید. همچنین به دلیل تولید سولفید آهن  $H_2S$ ، مرکزی سیاه رنگ دارند.

### ۳\_ نتایج محیط کشت TSI (Triple suger iron agar)

محیط کشت TSI حاوی سه قند لاکتوز، گلوکز و سوکروز و همچنین دارای معرف فنول رد و ترکیبات آهن دار و گوگرد دار است. به علت وجود شاخص فنول رد در محیط کشت، پس از تخمیر قندها و انجام تخمیر محیط اسیدی می شود و معرف فنول رد در محیط اسیدی به رنگ زرد در می‌آید. بنابراین تشکیل رنگ زرد در داخل لوله نشان دهنده‌ی تخمیر قند است. باتوجه به شکل در لوله TSI حاوی سالمونلا مشاهده می کنیم، در قسمت عمق لوله زرد رنگ و در قسمت مورب لوله ارغوانی و سیاه شده است. بنابراین باکتری توانایی تخمیر قند گلوکز را داشته و تنها گلوکز را تخمیر کرده است و همچنین به علت تولید گاز  $H_2S$  رسوب سیاه رنگ در لوله دیده می شود.

## نتایج

### ۱\_ نتایج محیط کشت مک کانکی آگار

این محیط برای جداسازی باکتری های گرم منفی و تخمیر کننده‌ی قند لاکتوز است. یک محیط کشت انتخابی و افتراقی است که برای باکتری های گرم منفی روده ای مورد استفاده قرار می گیرد. محیط مک کانکی حاوی املاح صفراوی و کریستال ویوله است که هر دو به عنوان مهارکننده در محیط کشت عمل می کنند و باعث می شوند باکتری های گرم مثبت در این محیط رشد نکنند. بر اساس توانایی تخمیر لاکتوز، محیط کشت مک کانکی به دو گروه باکتری‌های تخمیر کننده‌ی لاکتوز و غیر تخمیر کننده‌ی لاکتوز تقسیم میشود:

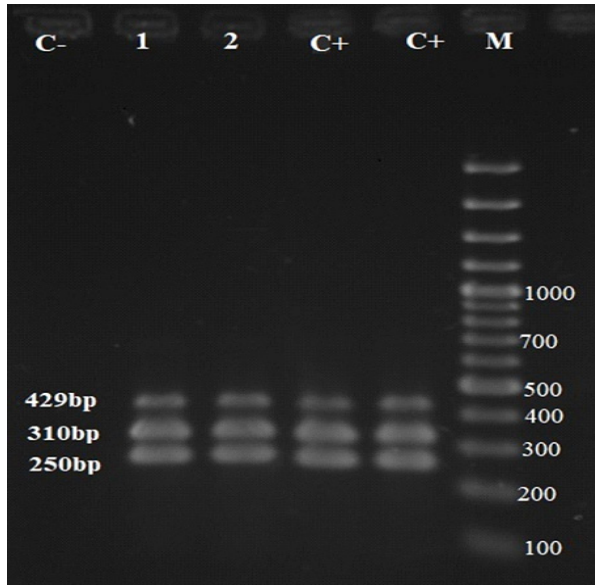
باکتری های تخمیر کننده‌ی لاکتوز (لاکتوز مثبت): کلنی های ارغوانی رنگ تولید می کنند.

باکتری‌های غیر تخمیر کننده‌ی لاکتوز (لاکتوز منفی): کلنی های بی رنگ تولید می کنند.

با توجه به نتایج آزمایش مشاهده شد، سالمونلا کلنی بی‌رنگ تولید میکند پس در نتیجه لاکتوز منفی است.

### ۲\_ نتایج محیط کشت XLDA ( Xylose lysin

decarboxycolate agar)



تصویر ۲: الکتروفورز محصولات PCR به منظور شناسایی جنس سالمونلا.

M: مارکر، ستون ۱، ۲: نمونه های مثبت شده، C<sup>+</sup>: کنترل مثبت سالمونلا انتریتیدیس، C<sup>-</sup>: کنترل منفی

پس نتیجه می گیریم سروتایپ غالب سالمونلا در جگر مرغ شهرستان ملایر، سالمونلا انتریتیدیس است.

### بحث

مطالعات در مورد سالمونلا انتریتیدیس نشان دهنده ی نقش مهم تاژک در این باکتری برای بیماریزایی می باشد. این باکتری قابل انتقال و بقا در سلول های میزبان بوده و برای مدت طولانی در داخل سلول ها زنده مانده و تکثیر می شود، بنابراین میتواند به آسانی بین گله های طیور منتقل شود.

نکته مهم دیگر اینکه در سال های اخیر الگوی آلودگی به سالمونلا از سالمونلا تیفی موریوم به سالمونلا انتریتیدیس تغییر یافته و در بسیاری از کشورهای دنیا بررسی آلودگی به باکتری سالمونلا انتریتیدیس و تشخیص به موقع آن



تصویر ۱: کنترل سالمونلا در محیط کشت TSI

### ۴\_ نتایج محیط کشت اوره آگار

برای بررسی توانایی باکتری در تجزیه اوره موجود در محیط و یا داشتن آنزیم اوره آز از محیط کشت اوره استفاده می کنیم. مشاهده میکنیم پس از کشت باکتری بر روی لوله، هیچ تغییر رنگی صورت نگرفته و محیط به رنگ زرد دیده می شود پس سالمونلا اوره آز منفی است.

سالمونلا	محیط کشت
لاکتوز منفی	مک کانکی
کلنی های قرمز رنگ با مرکز سیاه	XLD
ALK/Acid H <sub>2</sub> S	TSI
-	اوره

سروتایپ سالمونلا (آنتی سرم های دیفکو) تعیین گروه سرمی: گروه D، (O: 1,9,12, H<sub>1</sub>: g,m)، S. Enteritidis کلنی های مشکوک با روش مولکولی pcr وبا پرایمرهای invA بررسی گردید.

جزء آزمایشات مهم صنایع غذایی و مراکز کنترل بیماری ها محسوب می گردد.

در تحقیقی که در انگلستان روی نمونه های غذایی انجام شد، ۱۱۲ سویه سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت که سالمونلا انتریتیدیس با ۷۷ درصد در رتبه اول قرار گرفت.

همچنین در تحقیقی ۲۰۰ نمونه تخم مرغ، پوسته تخم مرغ، گوشت مرغ و گوشت قرمز از نظر آلودگی به سالمونلا به وسیله کشت و روشهای بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند که میزان آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس ۴۰ درصد و سالمونلا تیفی موریوم ۱۰ درصد گزارش شد.

در طی مطالعات ساله های اخیر، سالمونلا آنتریتیدیس شایع ترین سروتیپ سالمونلا در گله های طیور گزارش شده است، که از نظر بهداشت عمومی جامعه از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. نشانه های بیماری در انسان بسته به نوع سروتیپ سالمونلا و شرایط میزبان میتواند به صورت مسمومیت غذایی، گاستروآنتریت و تب روده ای بروز کند و در افراد پیر، خردسال و دچار ضعف سیستم ایمنی، فرم شدید بیماری و باکتری می دیده می شود که به دنبال آن پنومونی و مننژیت و نهایتاً مرگ و میر اتفاق می افتد. گاستروآنتریت متداول ترین عفونت سالمونلا در جوامع انسانی می باشد که در اثر سروتیپ های سالمونلا به ویژه سالمونلا آنتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم ایجاد می گردد.

طبق مطالعاتی که در استان گیلان انجام شد. کبد با ۵۰ درصد بیشترین میزان آلودگی سالمونلایی را تشکیل داد و سپس پوست و سکوم با ۲۵ درصد در جایگاه بعدی قرار داشتند. پژوهشی که در سال ۲۰۱۵ در استان البرز انجام شد بیشترین میزان جداسازی سالمونلا در کبد ۲۱/۶ درصد گزارش گردید. مطالعات گسترده ای در خصوص میزان آلودگی سالمونلایی مواد غذایی از جمله تخم مرغ در سرتاسر جهان انجام شده است که نتایج بسیار متفاوتی را نسبت به همدیگر و مطالعه حاضر نشان می دهد. به نظر می رسد که این تفاوت ها در میزان آلودگی به دلیل شرایط متفاوت اقلیمی، جامعه آماری و نمونه برداری و یا تفاوت در روش اندازه گیری باکتری سالمونلا باشد.

### نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر مؤید آلودگی ۲ درصدی نمونه جگر مرغ های مورد مطالعه در شهرستان ملایر به سالمونلا آنتریتیدیس بود. مواردی که در توجیه اختلاف نتایج سایر تحقیقات با نتایج بررسی حاضر میتوان بر شمرد، عبارتند از:

حساسیت روش های تشخیصی، واکسیناسیون گله های مادر، رعایت نکات بهداشتی در مزارع، کشتارگاه ها و مراکز عرضه محصولات.

با توجه به نقش محصولات طیور به عنوان منبع غذایی سرشار از پروتئین در سبد غذایی اقشار مختلف جامعه، آلودگی های میکروبی و انتقال بیماری های مربوطه از این

طریق تهدید عمده‌ای در رابطه با سلامت عمومی جامعه  
به حساب می‌آید و در این میان تشخیص سریع آلودگی  
نقش مهمی در کنترل انتقال و گسترش بیماری دار<sup>۴۷</sup>  
تحقیق حاضر نشان می‌دهد که با توجه به محدودیت‌ها و  
مشکلات روش‌های جداسازی آزمایشگاهی می‌توان از  
روش PCR به عنوان روشی حساس و سریع در تشخیص  
آلودگی نمونه‌های غذایی به باکتری سالمونلا انتریتیدیس  
استفاده کرد.

## References

1. Colavecchio, A., et al. (2017). "Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the Enterobacteriaceae family—a review." *Frontiers in microbiology* **8**: 1108.
2. Barua H1, Biswas PK, Olsen KE, Christensen JP. Prevalence and characterization of motile Salmonella in commercial layer poultry farms in Bangladesh. *PLoS ONE*. 7:e35914. (2012)
3. Acheson, D. and E. L. Hohmann (2001). "Nontyphoidal salmonellosis." *Clinical infectious diseases* **32**(2): 263-269.
4. Barua H1, Biswas PK, Olsen KE, Christensen JP. Prevalence and characterization of motile Salmonella in commercial layer poultry farms in Bangladesh. *PLoS ONE*. 7:e35914. (2012)
5. Michael PD, Beucha RL. Food microbiology Brdedition. Asm press. 2007: 219-187
6. Peighambari, s. M, Morshed ,R , Baziar , M sharifai , A , sadrzadeh , A , 2018 . salmonellosis in broiler flicks of Golestan province : frezquency , seroproups and druy resistance patterns of salmonella idolates . New findings in veterinary microbiology 1(1):70-78
7. Taheri, H., et al. (2018). "Pulse-field gel Electrophoresis (PFGE) of Salmonella serovar Infantis isolates from poultry." *Iran J Vet Med* **12**(3): 187-197.
8. Revolledo, L., et al. (2006). "Prospects in Salmonella control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity." *Journal of Applied Poultry Research* **15**(2): 341-351.
9. Carter G. and Chengapa M . Essential of Veterinary bacteriology and Mycology. Fourd edition. Iowa State University Press Ames . 1991 ; 126(129): 187-190
10. Salehi T.Z. Salmonella. University of Tehran Press 1999
11. Janda, J. M. and S. L. Abbott (2006). *The enterobacteria*, American Society for Microbiology (ASM).
12. Farmer 3rd, J., et al. (1985). "Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens." *Journal of clinical microbiology* **21**(1): 46-76.
13. Salehi T.Z. Salmonella. University of Tehran Press 1999
14. Joklik, W., et al. (1992). "Salmonella, Shigella, Escherichia coli." *Zinsser Microbiology* **20**: 556-563.
15. Salehi T.Z. Salmonella. University of Tehran Press 1999
16. Carter G. and Chengapa M . Essential of Veterinary bacteriology and Mycology. Fourd edition. Iowa State University Press Ames . 1991 ; 126(129): 187-190
17. Salehi T.Z. Salmonella. University of Tehran Press 1999
18. Quinn P.J , Markey B.K , Leonard F.C, et al . Veterinary microbiology and microbial disease . John Wiley & Sons. . 2011

19. Carter G. and Chengapa M . Essential of Veterinary bacteriology and Mycology. Fourd edition. Iowa State University Press Ames . 1991 ; 126(129): 187-190
20. Salehi T.Z. Salmonella. University of Tehran Press 1999
21. Joklik, W., et al. (1992). "Salmonella, Shigella, Escherichia coli." Zinsser Microbiology **20**: 556-563.
22. Salehi T.Z. Salmonella. University of Tehran Press 1999
23. Quinn P.J , Markey B.K , Leonard F.C, et al . Veterinary microbiology and microbial disease . John Wiley & Sons. . 2011



## **Investigating the level of salmonella contamination in the liver of chickens collected in Malair city.**

**Behnam Pedram<sup>1</sup>, Masoud Soltani Alvar<sup>1</sup>, Leila Derakhshan<sup>1</sup>, Peyman Sepehri Fard<sup>2</sup>, Bardia Mohammadi<sup>3</sup>.**

1. Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shushtar.
2. Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shushtar Azad University.
3. Doctor of Veterinary Medicine Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shushtar Azad University.

### **Abstract**

Salmonella is one of the most important and common infectious diseases of humans and animals that is caused by Salmonella bacteria and causes the death of many people from human and animal populations annually. Salmonella-infected poultry meat is the primary cause of infection transmission, so identifying the prevalence of Salmonella infection in poultry flocks is a necessary step in taking appropriate control measures to prevent the transmission of infection to human communities. For random sampling, 100 chicken livers were purchased from supermarkets in Malayer city, then sent to the laboratory to evaluate the level of Salmonella infection. After performing bacterial tests, Salmonella serotype was determined using PCR method. In the present study, it was found that 2% of chicken liver was infected with Salmonella bacteria. It should be noted that 2% of the samples had bacterial contamination. It was also found that the predominant salmonella serotype in chicken livers of Malayer city is Salmonella enteritidis. According to the results of the present study, it can be concluded that food of animal origin is a good source for the growth of Salmonella in the country and it is recommended that to prevent bacterial contamination, strict health measures to prevent Contamination of water and food should be done and other livestock products should be cooked enough.

**Keywords:** Salmonella, Liver, Chicken, Malayer.