

ردیابی انواع ژن های حدت در سرو تیپ های سالمونلا تیغی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس جدا

شده از گوشت مرغ در استان چهارمحال و بختیاری

حسن ممتاز^{۱*}، رضا قائدامینی^۲، منوچهر مومنی^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: hamomtaz@iaushk.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۵

چکیده

سالمونلوز، توسط باکتری های جنس سالمونلا ایجاد شده و یکی از شایع ترین بیماری های ناشی از مواد غذایی است که با اسهال، تب خفیف، تهوع، دردهای شکم و حتی مرگ، همراهی می شود. این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی سرو تیپ های شایع سالمونلا در گوشت مرغ و ردیابی عوامل حدت در آن ها انجام شد. به این منظور ۶۲۰ نمونه گوشت مرغ از سوپرمارکت ها در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری و پس از کشت و جداسازی سالمونلا و استخراج ژنوم، با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲۸ مورد از مجموع ۶۲۰ نمونه به گونه های سالمونلا آلوده بودند که از بین آن ها ۱۲ مورد سالمونلا تیغی موریوم، ۱۰ مورد سالمونلا انتریتیدیس و ۶ مورد به سرو تیپ های دیگر سالمونلا بودند. نتایج به دست آمده نشان داد که همگی سویه های سالمونلا تیغی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس جدا شده دارای عوامل حدت هستند. نتایج همچنین نشان داد که گونه های سالمونلا قادر به آلوده کردن گوشت مرغ می باشند، لذا رعایت دقیق فرآیند کنترل کیفی و بهداشتی گوشت مرغ بخصوص در کشتارگاه ها ضروری به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: سالمونلا تیغی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس، واکنش زنجیره ای پلی مرز، عوامل حدت، گوشت مرغ.

مقدمه

کشورمان وارد می کند، به عنوان یک بیماری منتقله از طریق مواد غذایی به انسان از نظر بهداشت عمومی جامعه نیز حائز اهمیت فراوانی است (Bohaychuk et al., 2007). در بررسی های انجام گرفته در برخی کشورها میزان شیوع آلودگی به سالمونلا را در مرغداری ها اغلب تا ۶۸/۹ درصد گزارش شده است (Vielitz, 1993). که در اغلب موارد، جدایه ها قادر به ایجاد بیماری در انسان نیز می باشد. اولین گزارش مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا در سال ۱۸۸۸ در آلمان صورت پذیرفت (Barnhart, 1991). آلودگی سالمونلایی در انسان به صورت مسمومیت غذایی، گاستروانتریت، تب تیفوئید و گاهی سپتی سمی بروز می کند. (طباطبائی و فیروزی، ۱۳۸۰). با توجه به اهمیتی که سالمونلوز پرندگان در اقتصاد و بهداشت عمومی جامعه دارد و از آنجا که در حال حاضر این

جنس سالمونلا متعلق به خانواده ای انتروباکتریاسه می باشد و تاکنون بالغ بر ۲۷۰۰ گونه مختلف از این میکروارگانیسم در نقاط مختلف دنیا شناسایی شده است. باکتری های جنس سالمونلا اجرام میله ای کوتاه، گرم منفی و به اندازه ی ۲-۴/۵ میکرون هستند که فاقد کپسول، دارای تاژک اطرافی (به استثناء سالمونلا گالیناروم و سالمونلا پولوروم که غیرمتحرک اند و اغلب دارای خار یا فیمبریه می باشند. سالمونلا دارای گسترش جغرافیایی وسیعی بوده و قادر به ایجاد عفونت در طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله انسان و پرندگان می باشند. پرندگان توسط گونه های متعددی از این باکتری آلوده می شوند (طباطبائی و فیروزی، ۱۳۸۰). سالمونلوز پرندگان علاوه برآنکه باعث تلفات قابل توجه در مرغداری ها بخصوص جوجه های با سن کم تر از دو هفته می شود و خسارات زیادی را به اقتصاد

مسئله به‌عنوان خطری جدی تلقی می‌شود این مطالعه با هدف بررسی و تعیین میزان آلودگی مرغ‌های مصرفی استان چهارمحال و بختیاری به سالمونلا و شناسایی و جداسازی انواع سروتیپ‌های شایع این باکتری یعنی سویه‌های تی‌پی موریوم و انتریتیدیس و ردیابی عوامل حدت در این سروتیپ‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

تعداد ۶۲۰ نمونه گوشت از لاشه‌های مرغ عرضه شده در فروشگاه‌های عرضه مرغ در یک دوره ۶ ماهه از آذر ۱۳۹۰ تا خرداد ۱۳۹۱ به‌صورت خوشه‌ای، تصادفی از ۴ منطقه‌ی شمال، جنوب، شرق و غرب استان چهارمحال و بختیاری اخذ شد. نمونه‌ها از عضله ران (حاوی پوست) به حجم ۱۰ گرم در کیسه‌های پلاستیکی استریل اخذ و در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید.

آزمون‌های میکروبی

نمونه‌های تهیه شده در محیط غنی کننده سلنیت F به مدت ۲۴ ساعت در ۴۳ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و بعد از رشد، در دو محیط افتراقی مک کانکی آگار (MC) و سالمونلا-شیگلا آگار (SS) کشت داده شدند. پرگنه‌های مشکوک به سالمونلا را که کلنی‌های بی‌رنگ با مرکز سیاه هستند جهت تأیید تشخیص به روش IMViC و کشت در محیط TSI، اوره و Lysin Iron Agar آزمایش و باکتری‌های جدا شده که دارای واکنش ++- در آزمایش IMViC و واکنش آلکالین/اسید با H₂S ضعیف در محیط TSI بودند انتخاب گردیدند و پس از کشت در محیط جامد BHI در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

آزمایش PCR

به منظور استخراج DNA از باکتری‌های مورد مطالعه از روش جوشاندن استفاده شد. برای این منظور ۲۵ میکرولیتر از کشت یک شبه باکتری در محیط مایع قلب مغز با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از ۱ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه، مایع رویی به‌عنوان منبع DNA استفاده شد. آزمایش PCR جهت شناسایی باکتری‌های جنس سالمونلا و ردیابی دو سروتیپ سالمونلا تی‌پی-موریوم و سالمونلا انتریتیدیس در قالب PCR چندگانه‌ای مطابق (Jamshidi et al. 2009) انجام گرفت. ردیابی حضور انواع ژن‌های حدت در این دو گونه شامل ژن‌های *fliB*، *fliC*، *rfbJ*، *invA* در سالمونلا تی‌پی-موریوم و ژن‌های *sefA*، *spv* در سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از زوج پرایمرهای معرفی شده توسط (Emaddi Chashni et al. 2006) که در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند انجام گرفت. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر از دستگاه (Eppendorf) Master Cycler Gradient با حجم ۵۰ میکرولیتر واحد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱ میلی مول MgCl₂، ۱۵۰ میکرومول dNTP، ۱۰۰ پیکومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت در سالمونلا تی‌پی-موریوم عبارت بود از یک سیکل ۹۴ درجه ۳ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۳ دقیقه و در مورد ردیابی ژن‌های حدت در سالمونلا انتریتیدیس برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از یک سیکل ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۷۵ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۶ دقیقه. در هر مرحله از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس جهت ردیابی محصول مورد نظر از

کننده ژل (Uvitec, UK)، نتیجه روی کاغذ حساس به حرارت ثبت گردید.

ژل یک درصد آگارز حاوی اتیدیوم بروماید استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به هر نمونه در بافر TBE 1X در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه، الکتروفورز و با انتقال ژل به دستگاه قرائت

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت در سالمونلا تیپ‌موریوم

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵'-۳')	ژن هدف	اندازه محصول (جفت باز)
ST139-s	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	<i>invA</i>	284
ST141-as	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
Rfbj-s	CCAGCACCGAGTTCCAACCTTGATAC	<i>rfbJ</i>	663
Rfbj-as	GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA		
Flic-s	ATAGCCATCTTACCAGTTCCCCC	<i>fliC</i>	183
Flic-as	GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC		
Fljb-s	ACGAATGGTACGGCTTCTGTAAAC	<i>fljB</i>	526
Fljb-as	TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG		
ST11	GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA	Random sequence*	429
ST14	GGTAGAAATCCCAGCGGGTACTGG		

* توالی هدف برای شناسایی جنس سالمونلا

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های حدت در سالمونلا انتریتیدیس

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵'-۳')	ژن هدف	اندازه محصول (جفت باز)
S1	GCCGTACACGAGCTTATAGA	<i>Spv**</i>	250
S4	ACCTACAGGGGCACAATAAC		
SEFA2	GCAGCGTTACTATTGCAGC	<i>sefA***</i>	310
SEFA4	TGTGACAGGGACATTTAGCG		

** توالی هدف برای شناسایی ژن حدت پلاسمیدی در گونه سالمونلا انتریتیدیس

*** توالی هدف برای شناسایی ژن کد کننده پادگن فیمبريال در گونه سالمونلا انتریتیدیس

نتایج

در مطالعه حاضر از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرز جهت ردیابی سرووارهای سالمونلا تیپ‌موریوم و سالمونلا انتریتیدیس و تعیین فراوانی حضور انواع ژن‌های حدت در این دو سروتیپ در سویه‌های جدا شده از گوشت مرغ استفاده شد. در این بررسی ۲۸ مورد از ۶۲۰ نمونه گوشت مرغ به‌عنوان گونه‌ای از جنس سالمونلا تشخیص داده شدند. استفاده از روش PCR نشان داد که از این ۲۸ نمونه مثبت، ۱۲ مورد (۱/۹۳ درصد) سالمونلا تیپ‌موریوم، ۱۰ مورد (۱/۶۱ درصد) مربوط به سالمونلا انتریتیدیس و ۶ نمونه (۰/۹۶ درصد) به‌عنوان گونه‌های دیگر سالمونلا (گونه‌های ناشناخته) می‌باشند. علاوه بر این نتایج نشان داد که تمام جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیپ‌موریوم دارای ژن‌های حدت هستند.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که واکنش زنجیره‌ای پلی مرز می‌تواند به‌عنوان یک روش دقیق برای تشخیص و شناسایی گونه‌های سالمونلا در نمونه‌های گوشت مرغ استفاده شود. مطالعات متعددی بر روی نمونه‌های مختلف بالینی مانند گنجشک خانگی (Emadi et al., 2010)، جوجه خانگی (Chashni, 2009) و گوشت مرغ و تخم مرغ (Malorny et al., 2007)، نشان دادند که واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، روش حساس، اختصاصی و دقیق برای جداسازی گونه‌های سالمونلا می‌باشد. از طرف

انجام گرفت میزان آلودگی لاشه‌های طیور گوشتی به باکتری سالمونلا مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۱۲ گله گوشتی تعداد ۶۰ نمونه سواب از ناحیه گردن طیور در یکی از کشتارگاه‌های صنعتی اطراف شهرستان مشهد اخذ گردید. در این بررسی، باکتری سالمونلا از ۱۱/۶۶٪ نمونه‌ها جداسازی گردید که در آزمایش سرولوژیک ۲۸/۶٪ متعلق به گروه سرمی B و ۷۱/۴٪ متعلق به گروه سرمی C بود (Jamshidi et al., 2008). مطالعه‌ای بر روی ۱۲۰ مرغ فله‌ای و مارک دار در سطح شهر زنجان نشان می‌دهد که ۱۰۴ نمونه (۸۶/۶٪) از نظر سالمونلا مثبت بودند و شایع‌ترین سروتیپ‌ها شامل *S. gallinarum* با ۲۳/۳٪، *S. agan* و *S. enteric* با ۱۳/۳٪، *S. entritidis* و *S. heideiberg* با ۱۰٪ شیوع بودند (شاپوری و همکاران، ۱۳۸۸). همچنین تعداد ۱۴۰ نمونه از مرغ‌های پرکنده و آماده فروش در شهر همدان جهت جداسازی انواع ونه‌های سالمونلا مورد آزمایش میکروبی قرار گرفتند که از این تعداد ۷۰ عدد را مرغ‌های منجمد و ۷۰ عدد دیگر را مرغ‌های تازه تشکیل می‌دادند. نمونه‌ها از پوست و ماهیچه برداشته شد که ۱۲ مورد (۸/۶ درصد) از مرغ‌های آزمایش شده آلوده تشخیص داده شدند. میزان آلودگی در مرغ‌های تازه بیش از منجمد بود و شایع‌ترین گونه‌های جدا شده سالمونلا تیفی‌موریوم و سالمونلا انتریتیدیس بودند (یوسفی مشعوف، ۱۳۷۹). در مطالعه دیگری در آذربایجان شرقی، در مجموع ۵۲۰ نمونه شامل ۴۰۰ نمونه مرغ، ۳۰ نمونه شترمرغ و ۹۰ نمونه کبوتر با نمونه‌گیری از عضله سینه، کبد و طحال مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۵۲۰ نمونه جمع‌آوری شده در این تحقیق، ۴۵ نمونه (۸/۶۵٪) از نظر آلودگی به سالمونلا مثبت بودند که میزان شیوع سالمونلا در مرغ، شترمرغ و کبوتر به ترتیب ۷/۲۵٪، ۶/۶۶٪ و ۱۵/۵۵٪ تعیین گردید که بعد از تعیین گروه‌های سرمی، جدایه‌ها در ۴ گروه سرمی d1، b، c1 و c2 قرار گرفتند و گروه سرمی d1 دارای بیش‌ترین فراوانی (۵۳/۳٪) بود.

دیگر مطالعات پیشین نشان دهنده شیوع گونه‌های سالمونلا در گوشت مرغ است. شیوع آلودگی به سالمونلا در لاشه مرغ در مطالعات مختلف در محدوده ۳ تا ۶۶ درصد گزارش شده است (Zhao et al., 2001; Uyttendaele et al., 1998). در تایلند، میزان شیوع گونه‌های سالمونلا در لاشه‌ی مرغ معادل ۸/۳ درصد (Shanmugasamy et al., 2011) گزارش شده است و در مطالعه‌ی دیگری از ۱۲۱ نمونه بافت مرغ و ۴۰ نمونه تخم مرغ فرآوری شده، ۷ مورد سالمونلا جدا شد (Taddele Menghistu et al., 2011). در مطالعه‌ای که در کشور مصر انجام گرفت، گونه‌های سالمونلا در ۵ مورد (۲۰ درصد) از گوشت گاو چرخ شده یخ زده، ۹ مورد (۳۶ درصد) از پای مرغ منجمد شده و ۱۳ مورد (۵۲ درصد) از نمونه‌های فیله منجمد جدا گردید (Hassanein et al., 2011). مطالعات قبلی نشان دادند که سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی‌موریوم شایع‌ترین سروتیپ‌های سالمونلا هستند که در انسان باعث بیماری می‌شوند (Aktas et al., 2007). در مطالعه‌ای که در بلژیک انجام گرفت مشخص شد که شیوع سالمونلا تیفی‌موریوم به اندازه‌ی سالمونلا انتریتیدیس نیست (Uyttendaele et al., 1998)، اما نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سالمونلا تیفی‌موریوم با ۱/۹۳ درصد بیش‌ترین میزان شیوع را دارد. نتایج مطالعه‌ای در نروژ ثابت کرد که سروار تیفی‌موریوم به‌صورت یک مخزن در پرندگان حیات وحش در نروژ یافت می‌شود و شواهد اپیدمیولوژی و باکتریولوژی نشان می‌دهد که پرندگان وحشی ممکن است عفونت را به انسان و مرغ انتقال دهند (Kapperud et al., 1998). در این راستا نتایج مطالعه دیگری که در بریتانیا بر روی لاشه ۷۷۹ پرنده وحشی (از جمله گنجشک خانگی) بین سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۳ انجام گرفت نشان داد که سالمونلا تیفی‌موریوم سروار غالب در پرندگان وحشی می‌باشد (Pennycott et al., 2006). در مطالعه‌ای که در ایران

5. Aktas, Z., Martin, D., Kayacan, C.B., Diren, S., and Threlfall, E.J. 2007. Molecular characterization of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Antimicrob Agent*. 30: 541-545.
6. Barnhart, H.M. 1991. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. *J Food Prot*. 54: 488-491.
7. Bohaychuk, V.M., Gensler, G.E., McFall, M.E., King, R.K., and Renter, D.G. 2007. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J Food Prot*. 70: 1080-1087.
8. Emaddi Chashni, S.H., Hassanzadeh, M., Bozorgmehri Fard, M.H., and Mirzaie, S. 2009. Characterization of the *Salmonella* Isolates from Backyard Chickens in North of Iran, by Serotyping, Multiplex PCR and Antibiotic Resistance Analysis. *Arch Razi Ins*. 64: 77-83.
9. Hassanein, R., Hassan Ali, S.F., Abdel-Malek, A.M., Mohamed, M.A., and Elsayh, K.I. 2011. Detection and identification of *Salmonella* species in minced beef and chicken meats by using Multiplex PCR in Assiut city. *Vet World* 4: 5-11.
10. Jamshidi, A., Bassami, M.R., and Afshari-Nic, S. 2009. Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. *Int J Vet Res*. 3: 43-48.
11. Jamshidi, A., Zahraei-salehi, T., and Afshin-Nics, S. 2008. Detection of *salmonella* spp Contamination of فراوانی گروه‌های سرمی b, c1 و c2 در کل نمونه‌های مورد آزمایش به ترتیب ۲۶/۶۶٪، ۱۱/۱۱٪ و ۸/۸۸٪ تعیین گردید (اکبرمهر، ۱۳۸۹). در مجموع، نتایج مطالعه حاضر و مطالعات قبلی حاکی از آلودگی لاشه‌های طیور به سالمونلا و خطر بالقوه این ماده غذایی در ایجاد آلودگی برای انسان می‌باشد، لذا تشخیص سریع آلودگی سالمونلایی در نمونه‌های مواد غذایی بیش از پیش حائز اهمیت می‌باشد. در کل استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت مطالعه کیفیت بهداشتی مرغ توصیه می‌شود و رعایت تمام شرایط بهداشتی در کشتارگاه‌ها و مراکز عرضه و از جمله نگهداری گوشت مرغ در درجه حرارت مناسب که می‌تواند بر کاهش بار میکروبی آن موثر باشد، اهمیت فراوانی دارد.
- منابع**
۱. اکبرمهر، جعفر. (۱۳۸۹). تعیین گروه‌های سرمی سالمونلاهای جدا شده از طیور و شناسایی ژن *hila* به روش PCR. *مجله زیست فن‌آوری میکروبی دانشگاه آزاد، دوره ۲، شماره ۶، صفحه ۳۸-۳۳.*
 ۲. شاپوری، رضا، رهنما، مهدی و اقبال زاده، شبنم. (۱۳۸۸). بررسی شیوع سروتایپ‌های سالمونلا در گوشت مرغ و تخم مرغ و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آنها در شهر زنجان. *فیزیولوژی و تکوین جانوری (علوم زیستی)*، دوره ۲، شماره ۳، صفحه ۷۱-۶۳.
 ۳. طباطبایی، عبدالمحمد حسنی و فیروزی، رویا. (۱۳۸۰). *بیماری‌های باکتریایی دام*. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۵۰۸.
 ۴. یوسفی مشعوف، رسول. (۱۳۷۹). بررسی شیوع آلودگی سالمونلایی در مرغهای عرضه شده برای مصرف در همدان. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زنجان*، سال هشتم، شماره ۳۳، صفحه ۴۷-۵۱.

229-233.

12. Kapperud, G., Stenwig, H., and Lassen, J. 1998. Epidemiology of *Salmonella* Typhimurium O:4-12 infection in Norway: evidence of transmission from an avian wildlife reservoir. Am J Epidemiol. 147: 774-782.
13. Malorny, B., Bunge, C., and Helmuth, R. 2007. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. J Microbiol Methods. 70: 245-251.
14. Mirzaie, S., Hassanzadeh, M., and Ashrafi, I. 2010. Identification and characterization of the *Salmonella* isolates from captured house sparrows by conventional serotyping, Multiplex PCR. Turk J Vet Anim Sci. 34: 181-186.
15. Pennycott, T.W., Park, A., and Mather, H.A. 2006. Isolation of different serovars of *Salmonella enteric* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. Vet Rec. 158: 817- 820.
16. Shanmugasamy, M., Velayutham, T., and Rajeswar, J. 2011. Inv A gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. Vet World. 4: 562-564..
- carcasses slaughtered in poultry abattoir in Mashhad, Iran. Arch Razi Ins. 62:
17. Taddele Menghistu, H., Rathore, R., Dhama, K., and Kumar Agarwal, R. 2011. Isolation, Identification and Polymerase Chain Reaction (PCR) Detection of *Salmonella* Species from Field Materials of Poultry Origin. Int J Microbiol Res. 2: 135-142.
18. Uyttendaele, M.R., Debevere, C.M., Lips, R.M., and Neyts, K.D. 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. Int J Food Microbiol. 40: 1-8.
19. Vielitz, E. 1993. Results of *Salmonella* vaccination trials. WHO Consultation of Salmonella infections in animals: Prevention of food borne *Salmonella* infections in humans. WHO/ CDS/ VPH/ 93.129, Jena, Germany.
20. Zhao, G., Ge, B., De Villena, J., Sudler, R., Emily Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., and Jianghong Meng, J. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C. Area. Appl Environ Microbiol. 67: 5431-543