

## دارای رتبه علمی- پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

### شناسایی ملکولی سروتایپ سالمونلای جداسده از تخم مرغ

#### چکیده

**زمینه و هدف:** سالمونلوز شایع ترین نوع مسمومیت غذایی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می باشد که توسط سروتایپ سالمونلا ایجاد می گردد. هدف از این پژوهش شناسایی سرووارهای سالمونلا در تخم مرغ های بومی استان کهگیلویه و بویراحمد و نیز ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداسازی شده می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه ۲۱۰ عدد تخم مرغ بومی از مناطق ده گانه استان کهگیلویه و بویراحمد جمع آوری گردید. به منظور جداسازی و تعیین هویت باکتری ها از آزمون های بیوشیمیایی استفاده گردید. پس از استخراج DNA ژنومی به کمک پرایمرهای عمومی *invA* و اختصاصی *sefA* و *fliC* به ترتیب جنس سالمونلا و سروتایپ سالمونلا انترتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم با روش *Multiplex PCR* مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته ها:** از مجموع نمونه های مورد بررسی ۱۴ عدد (۶/۶۶٪) از تخم مرغ ها آلوده به سالمونلا بودند. از این میان ۱۲ مورد (۵/۷۱٪) متعلق به سالمونلا تیفی موریوم و ۲ مورد (۰/۹۵٪) متعلق به سایر گونه های سالمونلا بودند. همچنین در هیچ یک از نمونه ها آلودگی به سالمونلا انترتیدیس مشاهده نگردید. بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰٪) و تئوماپاسین (۷۸/۵۷٪) بودند.

**نتیجه گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که سالمونلا تیفی موریوم سرووار غالب در ایجاد آلودگی در تخم مرغ های بومی استان می باشد. همچنین با توجه به شیوع گسترده مقاومت آنتی بیوتیکی سروتایپ های مختلف سالمونلا، اجتناب از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک در دامداری ها و مرغداری ها پیشنهاد می گردد.

**واژه های کلیدی:** سالمونلا، مقاومت دارویی، آنتی بیوتیک، *Multiplex PCR* کهگیلویه و بویراحمد

#### مهدی منادی

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران

#### محمد کارگر

دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران

#### اصغر نقی ها

استادیار میکروبیولوژی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران

#### اکرم نجفی

دانشجوی گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات زیست فن آوری دریایی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، ایران

#### رضا محمدی

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، ایران

#### نویسنده مسئول: محمد کارگر

پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳

آدرس: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

دریافت: ۹۲/۷/۲۷

ویرایش پایانی: ۹۳/۲/۲۰

پذیرش: ۹۳/۲/۲۴

#### آدرس مقاله

منادی م، کارگر م، نقی ها، نجفی ا، محمدی ر " شناسایی ملکولی سروتایپ سالمونلای جداسده از تخم مرغ " مجله علوم

آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت ۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۱۷-۲۴

سالمونلا یکی از منابع مهم بیماری‌های منتقله از طریق غذا در اکثر نقاط دنیا می‌باشد. به طوری که این باکتری موجب بروز گاستروانتریت خفیف تا سیتی سمی کشنده در انسان می‌گردد (۱). حیوانات و ماکیان از منابع اصلی این عامل بیماری‌زا به شمار می‌آیند. به طوری که انتقال بیماری از طریق مصرف غذاهای حیوانی مانند گوشت گاو، گوشت مرغ، تخم مرغ و همچنین شیر گزارش شده است (۲،۳). از عمومی‌ترین سروتایپ‌های جدا شده از طیور می‌توان به سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا هادار، سالمونلا هایدلبرگ و سالمونلا تیفی‌موریوم اشاره نمود (۴). سالمونلوز شایع‌ترین نوع مسمومیت غذایی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشد (۳). سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی‌موریوم از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده سالمونلوزیس در انسان محسوب می‌شوند (۵). اولین مورد وقوع مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا توسط Gartner در سال ۱۸۸۸ در آلمان گزارش گردید (۸). بیش از یک سوم موارد سالمونلوز در انسان بین سال‌های ۱۹۸۳ تا ۱۹۸۷ در ایالت متحده آمریکا با مصرف گوشت و تخم مرغ‌های آلوده پرندگان در ارتباط بوده است (۷). همچنین در سال‌های ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۶ در انگلستان و ولز از ۵۰۱ مورد مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا انتریتیدیس در انسان، ۱۷۸ مورد به علت مصرف گوشت و تخم پرندگان و فرآورده‌های آنها بوده است (۸). در طول دهه گذشته مقاومت ضد میکروبی و چند دارویی گونه‌های سالمونلا به مقدار زیادی افزایش یافته است. عامل پیدایش این افزایش استفاده از مواد ضد میکروبی در درمان انسان‌ها و حیوانات و همچنین اضافه کردن آنتی‌بیوتیک‌ها به رژیم غذایی حیوانات تعریف شده است (۹). این امر موجب افزایش معنی‌داری در فراوانی عفونت‌های سالمونلایی در برخی از کشورها در دهه گذشته شده است (۱۰). باکتری سالمونلا از محیط، نمونه‌های بالینی و مواد غذایی بعد از مرحله غنی‌سازی جداسازی شده و روش‌های مولکولی مانند PCR نتایج سریع و دقیقی را در تشخیص باکتری فراهم می‌نمایند (۱۱-۱۳). شیوع و موارد تک‌گیر سالمونلوزیس به صورت فراوان همراه با آلودگی مرغ و تخم مرغ با گونه‌های سالمونلا در ارتباط می‌باشد (۲). مطالعه

حاضر با هدف تعیین شیوع گونه‌های سالمونلا در تخم مرغ‌ها و نیز ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده انجام گردید.

### روش بررسی

در این مطالعه از خرداد ماه تا مرداد ۱۳۹۱ در مجموع ۲۱۰ عدد تخم مرغ بومی از مناطق ده گانه استان کهگیلویه و بویراحمد، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در ابتدا هر تخم مرغ به صورت جداگانه در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا باکتری‌های احتمالی پوسته شسته شوند. سپس به منظور ضد عفونی پوسته، تخم مرغ‌ها در الکل قرار داده شدند. پوسته آهکی با پنس استریل شکسته و محتویات با لوپ به طور کامل مخلوط و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C با سمپلر در آبگوشت سلنیت-F تلقیح گردید. همچنین برای جداسازی باکتری از پوسته تخم مرغ، از سرم حاصل از شستشوی باکتری‌ها در آبگوشت سلنیت-F استفاده گردید. تمامی نمونه‌های مورد بررسی پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C، بر روی محیط سالمونلا-شیکلا آگار به صورت سطحی کشت داده شدند. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور تأیید پرگنه‌های مشکوک به سالمونلا از محیط‌های افتراقی مانند اندول، لیزین دکربوکسیلاز، اوره آز، TSI و MR-VP استفاده گردید (۱۴،۱۵).

به منظور استخراج ژنوم باکتری از روش جوشاندن (boiling) استفاده شد. پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

در این مطالعه از پرایمرهای عمومی (*invA*) و اختصاصی (*fliC* و *sefA*) به ترتیب برای شناسایی جنس سالمونلا و سروتایپ سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی‌موریوم با روش Multiplex PCR استفاده گردید (جدول ۱). در پژوهش حاضر از سالمونلا کلراسوئیس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: PCR Buffer 10X (۲/۶ μl)، dNTP (۰/۵ μl)، MgCl<sub>2</sub> (۱ μl)، Taq DNA Polymerase (۰/۲۵ μl)، هر یک از پرایمرها (۱ μl)

حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های سالمونلا با روش انتشار دیسک طبق توصیه مؤسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) (۱۷) نسبت به ۸ آنتی بیوتیک شامل تری متوپریم (۵μg)، تتراسایکلین (۳۰μg)، پنی سیلین (۱۰μg)، کانامایسین (۳۰μg)، نئومایسین (۱۰μg)، سفالکسین (۵μg)، استرپتومایسین (۱۰μg) و سیپروفلوکسازین (۵μg) شرکت رسکو (دانمارک) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷C به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS و آزمون های آماری مربع کای و تست دقیق فیشر انجام گرفت. مرز معنی داری بر روی  $p < 0/05$  قرار داده شد.

۱)، DNA الگو (۲/۵ μl) و ۱۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Mastecycler Gradient, Eppendorf, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۳ درصد مورد الکتروفورز قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی (۳'---۵')

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (۳'---۵')	اندازه (جفت باز)
inv-F	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	۲۸۴
inv-R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
sefA1-F	GCACGGTTACTATTGCAGC	۳۱۰
sefA2-R	TGTGACAGGGACATTTAGCG	
fla15-F	CGGTGTTGCCAGCTTGCTAAT	۸۸۹

## یافته ها

جداسازی شده وجود ندارد ( $p=0/191$ ). نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که در مجموع میزان شیوع سالمونلا در پوسته و زرده تخم مرغ برابر و معادل ۳/۳۳ درصد می باشد. در این مطالعه بیشترین آلودگی پوسته تخم مرغ به سالمونلا در منطقه دهدشت گزارش شد. همچنین مناطق سی سخت و لیکک بیشترین آلودگی زرده تخم مرغ به گونه های سالمونلا را دارا بودند. روش ملکولی نشان داد که هر ۱۴ نمونه شناسایی شده در مرحله کشت میکروبی مربوط به جنس سالمونلا بوده اند. این مطلب با مشاهده باند ۲۸۴ جفت بازی تایید گردید. همچنین در ۱۲ مورد از نمونه های مثبت (۵/۷۱٪) با مشاهده باند ۵۵۹ جفت بازی آلودگی به گونه سالمونلا تیفی موریوم تایید شد. ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای

پس از انجام آزمون های بیوشیمیایی مشخص گردید که ۱۴ عدد (۶/۶۶٪) از تخم مرغ ها دارای آلودگی به جنس سالمونلا می باشند. از این میان ۱۲ مورد (۵/۷۱٪) متعلق به سالمونلا تیفی موریوم و ۲ مورد (۰/۹۵٪) متعلق به سایر گونه های سالمونلا بودند. همچنین در هیچ یک از نمونه ها آلودگی به سالمونلا انتریتیدیس مشاهده نگردید (جدول ۲). در پژوهش حاضر بیشترین آلودگی به گونه های سالمونلا در منطقه دهدشت (۲۸/۵۷٪) گزارش شد. کمترین میزان آلودگی در مناطق چاروسا، پشت، لنده و دیشموک مشاهده گردید. به طوری که در این مناطق هیچ نمونه مثبتی جداسازی نشد (جدول ۲). با استفاده از آزمون دقیق فیشر مشخص گردید که ارتباط معنی داری بین مناطق ده گانه و گونه های

بیوتیک های تری متوپریم، کانامایسین، استرپتومایسین و سیپروفلوکسازین بودند. به طوری که تمامی گونه های سالمونلا به آنتی بیوتیک های یاد شده حساس بودند (شکل ۱). (p=۰/۱۱۸)

جداسازی شده در این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی-بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰٪) و نتومایسین (۷۸/۵۷٪) می باشد. از طرفی کمترین میزان مقاومت مربوط به آنتی

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی نمونه مورد بررسی بر اساس منطقه و آلودگی (تعداد = ۱۴)

منطقه	<i>Salmonella typhimurium</i> (%)	<i>Salmonella enteritidis</i> (%)	<i>Salmonella</i> spp (%)	جمع کل (%)
چاروسا	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰
دیشموک	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰
لنده	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)
دهدشت	(۲۱/۴۳)۳	(۰)۰	(۷/۱۴)۱	(۲۸/۵۷)۴
چرام	(۱۴/۲۷)۲	(۰)۰	(۰)۰	(۱۴/۲۷)۲
یاسوج	(۱۴/۲۷)۲	(۰)۰	(۰)۰	(۱۴/۲۷)۲
سی سخت	(۷/۱۴)۱	(۰)۰	(۷/۱۴)۱	(۱۴/۲۷)۲
گچساران	(۷/۱۴)۱	(۰)۰	(۰)۰	(۷/۱۴)۱
باشت	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰
لیکک	(۲۱/۴۳)۳	(۰)۰	(۰)۰	(۲۱/۴۳)۳
جمع	(۸۵/۷۱)۱۲	(۰)۰	(۱۴/۲۸)۲	(۱۰۰)۱۴

جدول ۳- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جداسازی شده از تخم مرغ های بومی استان کهگیلویه و بویراحمد

آنتی بیوتیک ها	مقاوم (%)	نیمه حساس (%)	حساس (%)
تری متوپریم	-	-	(۱۰۰)۱۴
استرپتومایسین	-	-	(۱۰۰)۱۴
سیپروفلوکسازین	-	-	(۱۰۰)۱۴
نتومایسین	(۷۸/۵۸)۱۱	(۲۱/۴۲)۳	-
تتراسایکلین	-	(۲۸/۵۸)۴	(۷۱/۴۲)۱۰
پنی سیلین	(۱۰۰)۱۴	-	-
سفالکسین	-	(۲۱/۴۲)۳	(۷۸/۵۸)۱۱

و همکاران در سال ۱۹۹۷ با نمونه گیری از ۱۰۰ عدد تخم مرغ بومی و تخم اردک در عراق توانستند *سالمونلا تیفی* را از ۰/۶ درصد پوسته تخم اردک جداسازی نمایند (۲۳). Davis و W Roy نیز در سال ۱۹۹۶ آلودگی مزارع مرغ مادر به باکتری *سالمونلا* را ۱۱/۷ درصد گزارش نمودند. همچنین بیشترین گونه جداسازی شده *سالمونلا انتریتیدیس* معرفی گردید (۲۴). زارع و همکاران در سال ۲۰۰۸ در بررسی که در شهرستان ارومیه انجام دادند از مجموع ۱۰۰ تخم مرغ مورد آزمایش، ۶ عدد از آنها را آلوده به *سالمونلا* گزارش نمودند. پس از گروه بندی نمونه ها با استفاده از آنتی سرم پلی والان مشخص گردید که تمامی *سالمونلاهای* جداسازی شده متحرک و به گروه سرمی D (*سالمونلا انتریتیدیس*) تعلق داشتند (۲۵). این یافته ها با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر هم خوانی ندارد. زیرا در این پژوهش در هیچ یک از نمونه ها آلودگی به *سرووار سالمونلا انتریتیدیس* مشاهده نگردید. در مجموع شیوع آلودگی *سالمونلایی* در تخم مرغ های بومی استان نسبت به دیگر مطالعاتی که در سایر نقاط ایران انجام شده بیشتر است. اما مشابه مطالعات انجام شده در اروپا است. در مطالعه حاضر ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *سالمونلاهای* جداسازی شده نشان دهنده مقاومت ۱۰۰ درصدی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین بوده است. این امر می تواند به دلیل استفاده بیش از حد استاندارد از این آنتی بیوتیک در رژیم درمانی باشد. از طرفی تمامی گونه های *سالمونلا* نسبت به آنتی بیوتیک های تری متوپریم، کاناماسین، استرپتومایسین و سیروفلوکسازین دارای حساسیت ۱۰۰ درصدی بوده اند که ممکن است در اثر عدم استفاده از این آنتی بیوتیک ها در موارد درمانی در منطقه و عدم پیدایش مقاومت نسبت به آنها باشد. Tajbaksh و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های *سالمونلای* جدا شده از گوشت گاو، شیر و بز انجام دادند، بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی بیوتیک های نالیدیکسیک اسید، آمپی سیلین و تتراسایکلین گزارش نمودند (۳). Chaiwat و همکاران در سال ۲۰۱۲ مقاومت آنتی-بیوتیکی *سالمونلاهای* جدا شده از گوشت خوک را در ایالت

امروزه *سالمونلا* با بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ، به عنوان دومین علت بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده در آمریکا شناخته شده است (۱۸). از بین سروتیپ های مختلف *سالمونلا*، سروتیپ های *انتریتیدیس* و *تیفی* موریوم بیشترین میزان عفونت یا مسمومیت غذایی را در کشورهای آسیایی به ویژه کره، ژاپن و تایلند ایجاد می نمایند (۱۹). *سالمونلوز* از بیماری های عفونی مشترک بین انسان و دام می باشد و افزایش شیوع آن بین انسان و حیوان، به ویژه در دهه های اخیر، اهمیت بیماری را دو چندان می نماید. بنابراین به منظور جلوگیری از آلودگی *سالمونلا*، برنامه های نظارتی مورد نیاز می باشد. در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *سالمونلا* ۶/۶۶ درصد تشخیص داده شد که آلودگی غالب منطقه متعلق به *سالمونلا تیفی* موریوم با میزان ۵/۷۱ درصد بوده است. در مطالعه ای که Little و همکاران در سال ۲۰۰۶ در برخی از مناطق انگلستان انجام دادند، از مجموع ۱۵۷ تخم مرغی که پوسته آلوده داشتند، تنها محتویات ۱۰ عدد از آنها (۶/۳۶٪) آلودگی *سالمونلایی* داشتند (۲۰). این میزان آلودگی بیشتر از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است. Shahzad و همکاران در سال ۲۰۱۲ شیوع گونه های *سالمونلا* را در تخم مرغ و جعبه های تخم مرغ جمع آوری شده از مزارع مرغ پاکستان بررسی نمودند. در این مطالعه از مجموع ۳۸۴ نمونه میزان شیوع در پوسته تخم مرغ، محتوای تخم مرغ و جعبه های ذخیره کننده تخم مرغ به ترتیب ۳۸/۸۸ درصد، ۱۵ درصد و ۴۳/۹ درصد گزارش گردید (۲). Katz و Ching در سال ۱۹۹۱ با بررسی ۳۰۰ عدد تخم مرغ خوراکی در هاوایی موفق به جداسازی *سالمونلا* از پوسته ۹/۴ درصد تخم مرغ ها شدند (۲۱). میزان شیوع *سالمونلا* در سه مطالعه یاد شده بیشتر از نتایج به دست آمده در این پژوهش می باشد. شاید بتوان دلیل این امر را مرتبط با شرایط نگهداری مرغ و تخم مرغ و شرایط بهداشتی اقلیم مورد نظر دانست. جعفری و همکاران در سال ۲۰۰۵ میزان آلودگی به *سالمونلا* را در تخم مرغ های بومی اهواز با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژیک مورد ارزیابی قرار دادند. یافته های آنها نشان دهنده آلودگی ۱/۶۶ درصدی تخم مرغ های مورد بررسی بوده است (۲۲). shareef

### نتیجه گیری

این مطالعه شیوع گسترده سرووار سالمونلا تیفی موریوم در ایجاد آلودگی در تخم مرغ‌های بومی استان کهگیلویه و بویر احمد را نشان می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و دانشگاه علوم پزشکی یاسوج به دلیل حمایت‌های اجرایی از این پژوهش اعلام می‌دارند.

### References

- Gast RK, Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, et al. *Diseases of poultry*. 11<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 2003; 583-613.
- Shahzad A, Shahid Mahmood M, Hussain I, Siddique F, Zahid Abbas R. *Prevalence of Salmonella species in hen eggs and egg storing-trays collected from poultry farms marketing outlets of Faisalabad, Pakistan*. Pak J Agri Sci. 2012; 49(4): 565-568.
- Tajbakhsh F, Tajbakhsh E, Momenii E, Momenii R, Momenii M. *Determination of Antibiotic resistance in Salmonella Spp isolated from raw cow, sheep and goat's milk in Chaharmahal Va Bakhtiyari Province, Iran*. Global Veterinaria. 2013; 10(6): 681-685.
- Byrd JA, DeLoach JR, Corrier DE, Nisbet DJ, Stanker LH. *Evaluation of Salmonella serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses*. Avian Dis. 1999; 43(3): 39-47.
- Bayu Z, Asrade1 B, Kebede N, Sisay Z, Bayu Y. *Identification and characterization of Salmonella species in whole egg purchased from local markets in Addis Ababa, Ethiopia*. J Vet Med Anim Health. 2013; 5(5): 133-137.
- Barnhart HM. *Prevalence of Salmonella enteritidis and other serovars in ovaries of layer hens attime of slaughter*. J Food Prot. 1991; 54(2): 488-491.
- Taux RV. *Salmonella: A postmodern pathogen*. J Food Prot. 1991; 54: 563-568.
- Humphrey T, Wray C, Wray A. *Public- health aspects of Salmonella infection*. In: *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, UK. 2000; 245-263.
- Kumar K, Lakhera PC. *Isolation, plasmid profiling and antibiogram of Salmonella from poultry meat and environmental sources*. J Anim Res. 2013; 3(1): 53-57.
- Rahmani M, Peighambari M, Aaby Svendsen C, Cavaco L, Agers Y, Hendriksen R. *Molecular clonality and antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovars enteritidis and infantis from broilers in three Northern regions of Iran*. BMC Vet Res. 2013; 9: 66.
- Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, et al. *Evaluation of a multiplex PCR assay for*

ساکایی تایلند مورد بررسی قرار دادند. از نظر فراوانی بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین (۹۶٪)، آمپی سیلین (۵۰٪) و کمترین آن نسبت به سفوتاکسیم (۵٪) و سیپروفلوکسازین (۲٪) بوده است (۲۶). میزان متفاوت مقاومت آنتی بیوتیکی گزارش شده در مطالعات مختلف را می‌توان به استفاده بیش از حد استاندارد از آنتی‌بیوتیک‌ها در مناطق مختلف نسبت داد. این امر موجب می‌گردد که ژن مقاومت به روش‌هایی مثل کانجوگیشن و ترانسفرمیشن بین سویه‌های مختلف دست به دست شده و خود باعث گسترش هرچه بیشتر مقاومت میکروبی گردد.

- simultaneous identification of Salmonella sp., Salmonella Enteritidis and Salmonella typhimurium from environmental swabs of poultry houses*. Letters Appl Microbiol. 1999; 28(6): 113-117.
- Van Duijkeren E, Wannet WJ, Houwers DJ, Van Pelt W. *Antimicrobial susceptibilities of Salmonella strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001*. J Clin Microbiol. 2003; 41(4): 3574-3578.
- Sharifzadeh A, Doosti A, Gaafarian M. *The comparison between molecular and bacteriological detection for identification of abortion agents caused by Brucella and Salmonella in sheep in Shahrekord town*. J Microb World. 2009; 2(2): 101-104. [Persian]
- Nazer AHK, Safari GH. *Bacterial flora from dead-in-shell chicken embryos and their drug resistance in Fars Province of Iran*. Indian J Anim Sci. 1994; 64(10): 1006-1009.
- Mogbeli M, Shaebani AA, AkbariFar E. *Isolation of Vi antigen from Salmonella Typhi Ty2 and its animal test for preparation of vaccine*. J Microb World. 2009; 2(1): 7-11. [Persian]
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Veterinary microbiology and microbial disease*. 1<sup>th</sup> ed. Blackwell Science, 2002; 113-118.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement*. M100S222012. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.
- Foley SL, Lynne AM. *Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance*. J Anim Sci. 2008; 86: 173-187.
- Solhan S, Chan PP, Kurupatham L, Foong BH, Ooi PL, James L, et al. *An outbreak of gastroenteritis caused by Salmonella enterica serotype Enteritidis traced to cream cakes*. Western Pac Surveill Response J. 2011; 2(1): 23-30.
- Little C, Walsh S, Hucklesby L, Surman-Lee S, Pathak K, Hall Y, et al. *Salmonella contamination in non-UK*

produced shell eggs on retail sale in some regions of England. Euro Surveill. 2006; 11(11): 102-114.

21. Ching Lee MR, Katz AR. *Salmonella* egg survey in Hawaii. Evidence for routine bacterial surveillance. Am J Public Health. 1991; 81(6): 764-770.

22. Jafari R, Fazel Ara A, Deliran Nia A. *Salmonella* contamination of eggs native -consumed in Ahwaz. Proceedings of the Fourth Meeting of Veterinary Clinical Sciences. 2005; 3(1): 325.

23. Shareef AM, Al- Sanjary RA, Hassan AA. *Recovery of two types of Salmonella from eggs of range rearing hens*

*and ducks.* Iraqi J Vet Sci. 1997; 10 (2): 25-28.

24. Davis RH, Wray C. *Determination of an effective sampling regime to detect salmonella enteritidis in the environment of poultry units.* Vet Microb. 1996; 50(1-2): 117-127.

25. Zare M, Nayriz Naghdahi M, Rasuoli S, Delshad R. *Salmonella* isolation from egg yolk local city Uromie. J Vet Med, Islamic Azad Uni. 2008; 7(3): 51-57.

26. Chaiwat P, Phattharaphron C, Serirat P, Yukio M, Shigeki Y, Sumalee T. *Serotype antimicrobial susceptibility and genotype of Salmonella isolates from swine and pork in Sa Kaew Province, Thailand.* J Vet Med. 2012; 42(1): 21-27.

## Molecular Detection of *Salmonella* Serovar Isolated from Eggs

### Monadi, M. (MSc)

MSc of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch Jahrom, Iran

### Kargar, M. (PhD)

Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch Jahrom, Iran

### Naghiha, A. (PhD)

Assistant Professor of Microbiology, Department of Animal Science, College of Agriculture, Yasuj University, Yasuj, Iran

### Najafi, A. (MSc)

PhD Student of Marine Microbiology, The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

### Mohammadi, R. (MSc)

MSc of Microbiology, Herbal Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

**Corresponding Author:** Kargar, M.

**Email:** mkargar@jia.ac.ir

**Received:** 19 Oct 2013

**Revised:** 10 May 2014

**Accepted:** 14 May 2014

### Abstract

**Background and Objective:** Salmonellosis is the most common type of food poisoning in developed and developing countries that is caused by *Salmonella* serotype. Hence, we aimed to identify the *Salmonella* serovars in eggs obtained from Kohgiluyeh and Boyerahmad province and to evaluate antibiotic resistance of the isolated strains.

**Material and Methods:** In this study, 210 eggs were collected from Kohgiluyeh and Boyerahmad Province. The bacteria were isolated and identified using biochemical tests. After extraction of genomic DNA, *Salmonella* gender, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* were investigated by *invA*, *fliC* and *sefA* primers, respectively, using Multiplex PCR method.

**Results:** Of 210, 14 (6.66%) were contaminated with *Salmonella*. Of these, 12 (5.71%) were *Salmonella typhimurium* and 2 (0.95%) were related to *Salmonella* spp. None of the samples were contaminated with *Salmonella enteritidis*. The highest resistance was related to penicillin (100%) and neomycin (78.57%).

**Conclusion:** *Salmonella typhimurium* is the predominant serovar causing contamination in the eggs of this Province. Given the wide spread of antibiotic resistance in different serotypes of *Salmonella*, we recommend avoiding of indiscriminate use of antibiotics in livestock and poultry.

**Keywords:** *Salmonella*, Drug Resistance, Antibiotic, Multiplex PCR, Kohgiluyeh and Boyerahmad