ردیابی انواع ژن‌های حدت در سروتیپ‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از گوشت مرغ در استان چهارمحال و بختیاری

حسن ممتاز[1*]، محسن قائدامینی[2]، منوچهر مومنی[3]

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 دریافت: ۱۳۹۳/۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۴

چکیده

سالمونلوز، توسط باکتری‌های جنس سالمونلا ایجاد شده و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ناشی از مواد غذایی است که با اسهال، تب خفیف، تهوع، دردهای شکم و حتی مرگ، همراهی می‌شود. این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی سروتیپ‌های شایع سالمونلا در گوشت مرغ و ردیابی عوامل حدت در آن‌ها انجام شد. به این منظور ۶۲۰ نمونه گوشت مرغ از سوپرمارکت‌ها در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری و پس از کشت و جداسازی سالمونلا و استخراج ژنوم، با روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲۸ مورد از مجموع ۶۲۰ نمونه به گونه‌های سالمونلا آلوده بودند که از بین آن‌ها ۱۲ مورد *سالمونلا تیفی‌موریوم*، ۱۰ مورد *سالمونلا انتریتیدیس* و ۶ مورد به سروتیپ‌های دیگر سالمونلا بودند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که همه‌ی سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده دارای عوامل حدت هستند. نتایج همچنین نشان داد که گونه‌های سالمونلا قادر به آلوده کردن گوشت مرغ می‌باشند، لذا رعایت دقیق فرآیند کنترل کیفی و بهداشتی گوشت مرغ بخصوص در کشتارگاه‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *سالمونلا انتریتیدیس*، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ، عوامل حدت، گوشت مرغ.

مقدمه

جنس سالمونلا متعلق به خانواده‌ی انتروباکتریاسه می‌باشد و تاکنون بالغ بر ۲۷۰۰ گونه مختلف از این میکروارگانیسم در نقاط مختلف دنیا شناسایی شده است. باکتری‌های جنس سالمونلا اجرام میله‌ای کوتاه، گرم منفی و به اندازه‌ی ۴/۵-۲ میکرون هستند که فاقد کپسول، دارای تاژک اطرافی (به استثناء *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پولوروم* که غیرمتحرک اند و اغلب دارای خار یا فیمبریه می‌باشند. سالمونلا دارای گسترش جغرافیایی وسیعی بوده و قادر به ایجاد عفونت در طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله انسان و پرندگان می‌باشند. پرندگان توسط گونه‌های متعددی از این باکتری آلوده می‌شوند (طباطبائی و فیروزی، ۱۳۸۰). سالمونلوز پرندگان علاوه برآنکه باعث تلفات قابل توجه در مرغداری‌ها بخصوص جوجه‌های با سن کم‌تر از دو هفته می‌شود و خسارات زیادی را به اقتصاد کشورمان وارد می‌کند، به‌عنوان یک بیماری منتقله از طریق مواد غذایی به انسان از نظر بهداشت عمومی جامعه نیز حائز اهمیت فراوانی است (Bohaychuk et al., 2007). در بررسی‌های انجام گرفته در برخی کشورها میزان شیوع آلودگی به سالمونلا را در مرغداری‌ها اغلب تا ۶۸/۹ درصد گزارش شده است (Vielitz, 1993). که در اغلب موارد، جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری در انسان نیز می‌باشد. اولین گزارش مسمومیت غذایی ناشی از سالمونلا در سال ۱۸۸۸ در آلمان صورت پذیرفت (Barnhart, 1991). آلودگی سالمونلایی در انسان به‌صورت مسمومیت غذایی، گاستروانتریت، تب تیفوئید و گاهی سپتی‌سمی بروز می‌کند. (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

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 تیفی موریوم و انتریتیدیس و ردیابی عوامل حدت در این سروتیپ‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

نمونه گیری

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 میکروب 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 تأئید 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 تیفی-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 *invA*، *rfbJ*، *fliC*، *fliB* در *سالمونلا تیفی‌موریوم* و ژن‌های *spv*، *sefA* در *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از زوج پرایمرهای معرفی شده توسط (Emaddi Chashni et al. 2006) که در جداول ۱و ۲ نشان داده شده‌اند انجام گرفت. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر از دستگاه (Eppendorf) Master Cycler Gradient با حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱ میلی مول $MgCl_2$، 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 تیفی‌موریوم* 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 پلی مراز جهت ردیابی محصول مورد نظر از

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

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

نام پرایمر	توالی پرایمر (۵'-۳')	ژن هدف	اندازه محصول (جفت باز)
ST139-s ST141-as	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	*inv*A	284
Rfbj-s Rfbj-as	CCAGCACCAGTTCCAACTTGATAC GGCTTCCGGCTTTATTGGTAAGCA	*rfb*J	663
Flic-s Flic-as	ATAGCCATCTTACCAGTTCCCCC GCTGCAACTGTTACAGGATATGCC	*fli*C	183
Fljb-s Fljb-as	ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG	*flj*B	526
ST11 ST14	GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG	Random sequence*	429

*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 S4	GCCGTACACGAGCTTATAGA ACCTACAGGGGCACAATAAC	*Spv***	250
SEFA2 SEFA4	GCAGCGGTTACTATTGCAGC TGTGACAGGGACATTTAGCG	*sef*A***	310

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

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

نتایج

در مطالعه حاضر از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت ردیابی سروارهای *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* و تعیین فراوانی حضور انواع ژن-های 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 تیفی‌موریوم*، 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 جدایه-های *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* دارای ژن‌های حدت هستند.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که واکنش زنجیره‌ای پلی مراز 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 (Mirzaie et al., 2010)، جوجه خانگی (Emadi Chashni, 2009) و گوشت مرغ و تخم مرغ (Malorny et al., 2007)، نشان دادند که واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، روش حساس، اختصاصی و دقیق برای جداسازی گونه‌های سالمونلا می‌باشد. از طرف 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 *تیفی موریوم* 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 تیفی موریوم* سروار غالب در پرندگان وحشی می‌باشد (Pennycott et al., 2006). در مطالعه‌ای که در ایران 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 کشتارگاه های 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 درسطح 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 نمونه گیری 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 وگروه سرمی d1 دارای بیش‌ترین فراوانی (۵۳/۳٪) بود. 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 پلی‌مراز 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 ۵۱-۴۷.

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 inovaries of layer hens attime 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 carcasses slaughtered in poultry abattoir in Mashhad, Iran. Arch Razi Ins. 62: 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..
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