University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 78, Number 2, 2023, 109-118

Tracking and Identifying Enterobacteriaceae Contamination in Darkling Beetles (Tenebrionidae) as One of the Reservoirs of Bacteria Persistence Poultry Farms

Pegah Mokhtari[1]✉, Alireza Jalalizand[2]✉, Esmaeil Mahmoudi[2]✉, Ghalamreza Ghalamkari[3]✉

[1] *Graduated from the Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran*
[2] *Department of Plant Protection and Entomology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran*
[3] *Department of Animal Science, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran*

Received: *15 January 2023*, ***Accepted:*** *19 March 2023*

10.22059/jvr.2023.355362.3327 20.1001.1.20082525.1402.78.2.4.8

Abstract

BACKGROUND: Poultry farming is one of the most productive and economic agricultural sectors. However, the bacterial contamination and the activity of darkling beetles (Tenebrionidae) as a potential reservoir of *Salmonella* in meat poultry farms can inflict direct and indirect damages.

OBJECTIVES: The present study aimed to identify the darkling beetles and their accompanying Enterobacteriaceae contamination in Isfahan chicken farms.

METHODS: Darkling beetles were collected and identified based on their morphological aspects from different parts of 16 poultry farms (4 from each geographical area) in Isfahan Province, Iran. Then, 80 samples of darkling beetles were cultured on selective-differential media culture of the Enterobacteriaceae family using the homogenization and enrichment method. The isolated bacteria were identified based on physiological and molecular characteristics. Also, specific antisera were used to determine serological groups.

RESULTS: The results revealed that all collected darkling beetles' samples belonged to the species *Alphitobius diaperinus* (Col., Tenebrionidae), and from 80 microbial culture samples from the beetles, isolated bacteria belonged into 4 genera: *Escherichia sp*. (20 isolates, 25 %), *Klebsiella sp.* (8 isolates, 10 %), *Proteus sp.* (22 isolates, 27.5 %), and *Salmonella sp.* (30 isolates, 37.5 %). Among them, the *Salmonella* genus accounted for the highest percentage of darkling beetles' contamination. In the serological assay, the isolated *Salmonella* were classified into two serogroups, A (23 isolates, 76.67 %) and C (C2 and C3) (7 isolates, 23.33 %), which the A serogroup was the most frequent.

CONCLUSIONS: In this study, the *A. diaperinus* species was isolated and identified for the first time from poultry farms, and this pest, with a high percentage of *Salmonella* infection, is introduced as one of the reservoir sources of bacterial contamination in the broiler farms.

Keywords: *Alphitobius diaperinus*, Entrobacteriaceae, *Klebsiella*, *Salmonella*, Poultry farm

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Alireza Jalalizand, Tel/Fax: +9831-35002291 / +9831-35354048

How to cite this article:

Mokhtari P, Jalalizand A, Mahmoudi E, Ghalamkari G. Tracking and Identifying Enterobacteriaceae Contamination in Darkling Beetles (Tenebrionidae) as One of the Reservoirs of Bacteria Persistence Poultry Farms. J Vet Res, 2023; 78(2): 109-118. doi: 10.22059/jvr.2023.355362.3327

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Results of Microbial Culture Experiments and Abundance of Bacteria Isolated From *A. diaperinus.*

Table 2. The Mean (%) ± Standard Error of Bacterial Contamination in *A. diaperinus* in Different Regions.

Table 3. The Mean (%) ± Standard Error of Different Bacterial Contamination in Live and Dead Adult Insects of *A. diaperinus.*

Figure 1. Gel Electrophoresis of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products of *Salmonella sp.* Isolated From Darkling Beetles (*A. diaperinus*).

Note: Lane M: 100-bp DNA ladder; Lane 1: PCR mixture without DNA template as negative control 1; Lane 2: PCR mixture with DNA template of *Bacillus sp.* as negative control 2; Lane 3, 4, 5, and 6: *Salmonella* sp. isolates.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۸، شماره ۲، ۱۴۰۲، ۱۱۸-۱۰۹

ردیابی و شناسایی آلودگی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه در سوسک‌های سیاه شب‌رو (Darkling beetles, Tenebrionidae) به عنوان یکی از مخازن ماندگاری باکتری‌ها در مرغداری‌ها

پگاه مختاری[۱]، علیرضا جلالی زند[۲]، اسماعیل محمودی[۲]، غلامرضا قلمکاری[۳]

[۱] دانش آموخته واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
[۲] گروه گیاهپزشکی و حشره‌شناسی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
[۳] گروه علوم دامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶ بهمن ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۳۰ فروردین ۱۴۰۲

10.22059/jvr.2023.355362.3327 20.1001.1.20082525.1402.78.2.4.8

چکیده

زمینه مطالعه: صنعت مرغداری یکی از بزرگ‌ترین بخش‌های تولیدی و اقتصادی در حوزه کشاورزی به شمار می‌آید که وجود آلودگی‌های باکتریایی و فعالیت سوسک‌های شب‌رو (Darkling beetles) به عنوان مخزن احتمالی *سالمونلا* در مرغداری‌های گوشتی، سبب بروز آسیب‌های مستقیم و غیرمستقیم می‌گردد.

هدف: مطالعه حاضر با هدف شناسایی سوسک‌های سیاه شب‌رو و آلودگی‌های باکتریایی خانواده انتروباکتریاسه همراه آن‌ها در مرغداری‌های شهرستان اصفهان انجام شد.

روش‌کار: سوسک‌های سیاه شب‌رو بر اساس شکل ظاهری از قسمت‌های مختلف ۱۶ مرغداری (چهار مرغداری از هر منطقه جغرافیایی) شهرستان اصفهان جمع‌آوری و شناسایی شدند. سپس ۸۰ نمونه از سوسک‌های سیاه شب‌رو به روش هموژنیزه و غنی‌سازی روی محیط‌های کشت انتخابی-افتراقی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه کشت شدند و باکتری‌های جدا شده بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی شناسایی شدند. همچنین برای تعیین گروه‌های سرولوژیکی باکتری‌های مورد نظر از آنتی‌سرم‌های اختصاصی استفاده شد.

نتایج: تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده از سوسک‌های سیاه شب‌رو متعلق به گونه *Alphitobius diaperinus* بودند و از نمونه‌های کشت میکروبی انجام شده از بدن سوسک‌ها، باکتری‌های جداسازی شده متعلق به جنس‌های *Escherichia sp.* (تعداد ۲۰ نمونه، ۲۵ درصد)، *Klebsiella sp.* (تعداد ۸ نمونه، ۱۰ درصد)، *Proteus sp* (تعداد ۲۲ نمونه، ۲۷/۵ درصد) و *Salmonella sp.* (تعداد ۳۰ نمونه، ۳۷/۵ درصد) بودند که از این میان، باکتری *Salmonella sp.* بیشترین درصد آلودگی سوسک‌ها را به خود اختصاص داد. در آزمون تعیین گروه‌های سرولوژیکی، سالمونلاهای جدا شده در دو گروه سرمی A (۲۳ نمونه، ۷۶/۶۷ درصد) و C (C2 و C3) (۷ نمونه، ۲۳/۳۳ درصد) قرار گرفتند که گروه سرمی A بیشترین فراوانی را داشت.

نتیجه‌گیری نهایی: در مطالعه حاضر سوسک *A. diaperinus* برای نخستین بار از مرغداری‌های شهرستان اصفهان جداسازی و شناسایی شد. همچنین این حشره با درصد بالای آلودگی به باکتری *سالمونلا*، به عنوان یکی از منابع پایداری آلودگی‌های باکتریایی در مزارع پرورش مرغ گوشتی معرفی می‌شود.

کلمات کلیدی: انتروباکتریاسه، *سالمونلا*، *کلبسیلا*، مرغداری، *Alphitobius diaperinus*

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: علیرضا جلالی زند، گروه گیاهپزشکی و حشره‌شناسی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

مقدمه

پرورش مرغ گوشتی یکی از صنایع مهم تولیدی و سودآور بخش کشاورزی می‌باشد که توجه به حفظ بهداشت و سلامت مرغداری‌ها و مزارع پرورش طیور در افزایش تولید و بهره‌وری آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۱). در طی دوره پرورش جوجه‌های گوشتی یا مرغ‌های تخم‌گذار، فضولات آن‌ها بستر مناسبی را برای رشد عوامل بسیار خطرناک و بیماریزای جوجه‌ها ایجاد می‌کند (۲). بندپایان به عنوان یکی از

مهم‌ترین تهدیدات صنعت مرغداری سبب بروز آسیب‌های مستقیم و غیرمستقیم می‌گردد. تنوع بندپایان در فضولات جمع شده در مکان‌های پرورش پرندگان بسیار بالاست که مهم‌ترین آن‌ها شامل کنه‌ها و حشرات راسته‌های سخت بالپوشان (Coleoptera)، دوبالان (Diptera)، سوسری‌ها (Blattidae) و شپش‌ها (Phthiraptera) می‌باشند (۱، ۳). در این میان، حشرات خانواده Tenebrionidae با نام سوسک‌های سیاه شب‌رو (Darkling beetles)، از آفات مهم و کلیدی محصولات انباری و مرغداری‌ها در سراسر جهان می‌باشند. این آفات همه چیزخوار بوده و از آرد، دانه‌های غلات مرطوب و کپک زده، بستر مرغی تا لاشه طیور تغذیه می‌کند (۴، ۵).

سوسک‌های *Alphitobius diaperinus* (Col., Tenebrionidae) با هجوم و تکثیر در مرغداری‌ها، توسط جوجه‌ها خورده می‌شوند و به دلیل توانایی ضعیف پرندگان در هضم کیتین حشرات، استرس تغذیه‌ای در جوجه‌ها ایجاد می‌کنند. این حشرات به دلیل میزبانی طیف وسیعی از باکتری‌ها (*Escherichia coli*، *Salmonella entrica*، *S. typhimurium* و *Campylobacter jejuni*)، ویروس‌ها (بیماری بورس عفونی و کروناویروس بوقلمون) و پروتوزوآی عامل بیماری کوکسیدیوزیس، ناقل چندین بیماری برای طیور می‌باشند (۶، ۷). همچنین این آفت با حفر کانال‌ها و گودال‌های زیاد در مواد عایق کف مرغداری‌ها، جهت ایجاد فضای مناسب برای شفیره‌سازی، مشکلات عمده‌ای را برای محل‌های پرورش طیور ایجاد می‌کند (۸).

از میان عوامل بیماریزای فوق، باکتری *سالمونلا* به عنوان مهم‌ترین عامل بیماریزای باکتریایی مشترک بین انسان و طیور و از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی در جهان محسوب می‌شود که سالیانه خسارت‌های زیادی در ابعاد مختلف بهداشتی و اقتصادی به‌طور مستقیم و غیر مستقیم بر جوامع انسانی وارد می‌کند (۹، ۱۰).

Agabou و Alloui در سال ۲۰۰۸ توان بالقوه سوسک‌های *A. diaperinus* را به‌عنوان مخزن باکتری‌های مختلف، روی بلدرچین مورد ارزیابی قرار دادند و در حشرات کامل بیشترین پاتوژن‌ها شامل باکتری‌های گرم منفی، استرپتوکوک‌ها و کلی‌فرم‌ها را گزارش کردند. همچنین در سوسک‌های مورد بررسی، گروه‌های سرمی C1 وD سالمونلا را گزارش کردند (۲). Roche و همکاران در سال ۲۰۰۹ تأیید کردند که سوسک‌های *A. diaperinus* به‌عنوان ناقل *سالمونلا* در جوجه‌ها می‌باشند که با تغذیه جوجه از لارو و حشره کامل آلوده به *S. thyphomorium*، میزان آلودگی بین ۴۵ تا ۵۸ درصد در سه هفته و ۱۱ تا ۲۷ درصد در شش هفته بعد از تغذیه، در مرغ‌ها مشاهده شد. نتایج نشان داد آلوده شدن جوجه‌ها از طریق تغذیه با این حشره، می‌تواند موجب انتقال بیماری‌ها به سایر جوجه‌های گوشتی از طریق مدفوع گردد (۱۱، ۱۲). طبق مطالعه Strother و همکاران در سال ۲۰۰۲ سوسک‌های *A. diaperinus* به‌عنوان ناقل عمده بیماری‌های طیوری و منبع آلودگی بیماری‌های *سالمونلا* و *کمپیلوباکتر* از بین ۱۱۳ مطالعه صورت گرفته از سوسک‌های بالغ، ۲۳/۹ درصد برای *سالمونلا* و ۱۴/۹ درصد برای *کمپیلوباکتر* گزارش شد (۱۳). همچنین سوسک‌های *A. diaperinus* آلوده به *سالمونلا* پاراتیفی B واریته *جاوا* و *کمپیلوباکتر ژژونی* می‌باشند که از ۵۰ تا ۱۰۰ درصد از طریق تغذیه به گله‌های طیور قابل انتقال است (۳).

اگرچه همه ساله مطالعات زیادی در مناطق مختلف جهان در خصوص *سالمونلاها* انجام می‌گیرد با این حال به علت تنوع گونه‌ای و گستردگی طیف میزبانی *سالمونلاها*، تحقیقات بیشتر درباره این باکتری و روش‌های پایداری و انتقال آن در مزارع پرورش طیور اهمیت زیادی دارد. براین اساس مطالعه حاضر با هدف شناسایی سوسک‌های سیاه شب‌رو (Tenebrionidae) در مرغداری‌های پرورش مرغ گوشتی و همچنین شناسایی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه و تعیین درصد آلودگی همراه آن‌ها در مرغداری‌های شهرستان اصفهان انجام شد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری و شناسایی سوسک‌های شب‌رو از مرغداری‌ها: طی بازدید از ۱۶ مرغداری پرورش مرغ گوشتی نژاد راس در چهار منطقه جغرافیایی شهرستان اصفهان (منطقه شمال با ۱۶ نمونه از چهار مرغداری، منطقه غرب با ۱۲ نمونه از سه مرغداری، منطقه جنوب با ۲۰ نمونه از شش مرغداری و منطقه شرق با ۱۲ نمونه از سه مرغداری)، حشرات کامل سوسک‌های شب‌رو Darkling beetles به‌طور تصادفی از قسمت‌های مختلف مرغداری مانند عمق فضولات بستر، درز و شکاف دیوارها و زمین، آب خوری‌ها و دانه‌خوری‌ها جمع‌آوری و در محلول الکل ۷۵ درصد و گلیسرین ۵ درصد قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت شناسایی نمونه از کلیدهای حشره‌شناسی (۱۴، ۱۵) و تأیید

تشخیص گونه در بخش جانورشناسی موزه تاریخ طبیعی بوداپست مجارستان (توسط دکتر اوتو مرکل) انجام شد. لازم به ذکر است در مطالعه حاضر موازین اخلاقی کار با حیوانات که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (۴۰۲-۰۴-۱۴-۲۱۹۶)، رعایت شد.

جداسازی باکتری‌ها از سوسک‌های سیاه شب‌رو: به منظور جداسازی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از روش Akbar & Kumar (۱۶) با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین صورت که سوسک‌های جمع‌آوری شده از ۱۶ مرغداری را با مقداری کود بستر، درون ظروف پلاستیکی قرار داده و جهت جداسازی عوامل باکتریایی همراه آن‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. پس از جداسازی نمونه‌ها از بستر، سوسک‌های هر منطقه به‌صورت تصادفی در ۵ تکرار همگن گردید. سپس از هر نمونه ۵ گرم در شرایط استریل به ۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر آب پپتون (محیط پیش غنی‌سازی) اضافه شد و پس از مخلوط نمودن نمونه‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۱±۳۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (غنی‌سازی اولیه). سپس جهت غنی‌سازی نهایی، ۱ میلی‌لیتر از مخلوط بالا به ۹ میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده تتراتیونات، به همراه برلیانت گرین، ید و نئوبیوسین منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱±۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (غنی‌سازی ثانویه). برای جداسازی باکتری‌ها از محیط‌های کشت انتخابی- افتراقی گزیلولیزین دزوکسی کلات (XLD) آگار و مک کانکی (Macconky) آگار استفاده شد. بدین منظور یک لوپ کامل از هر نمونه غنی شده به‌صورت مخطط روی محیط‌های فوق کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۱±۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ پس از تشکیل پرگنه‌ها روی محیط کشت، ۳ تا ۵ تک پرگنه باکتری از محیط انتخاب و خالص‌سازی شدند. جهت شناسایی باکتری‌ها از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن‌ها (۱۷، ۱۸) و با استفاده از کیت‌های تشخیص باکتری‌ها (شرکت QUELAB، کانادا) استفاده شد.

شناسایی مولکولی باکتری *سالمونلا*: با توجه به اهمیت باکتری *سالمونلا* و آلودگی‌های آن در طیور، برای شناسایی دقیق‌تر جدایه‌های *سالمونلا*، از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن *invA* به نام‌های ST139-F (5′-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3′) و ST141-R (5-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3) در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) استفاده شد (۱۹). استخراج DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن (۲۰) و آزمون زنجیره‌ای پلیمرازی با استفاده کیت‌های شرکت تکاپوزیست (DynaBio, Cat No. PCR-201XS) انجام شد. بدین صورت که حجم واکنش برای هر نمونه ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر مخلوط PCR (مستر میکس)، ۲ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۹ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده باکتری‌ها در نظر گرفته شد. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر اپندورف (آلمان) به شرح ذیل انجام گرفت: واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. سپس ۸ میکرولیتر از محصول نهایی PCR با ۳ میکرولیتر از رنگ بارگذاری (6X loading dye) مخلوط، روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز و با محلول اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شد. سپس قطعات تکثیر شده DNA در زیر نور ماوراء بنفش مشاهده شد (۱۸، ۲۰، ۲۱).

تعیین گروه‌های سرولوژیکی باکتری *سالمونلا*: برای تعیین گروه‌های سرمی باکتری *سالمونلا*، آزمایش آگلوتیناسیون روی لام و با استفاده از کیت آنتی سرم‌های اختصاصی (شرکت بهارافشان، تهران) انجام شد. بدین صورت که ابتدا سوسپانسون غلیظ از باکتری مورد نظر و سرم فیزیولوژی روی لام شیشه‌ای تهیه سپس یک قطره از سرم پلی والان O به مجموعه اضافه گردید. ایجاد اگلوتیناسیون در مدت زمان کمتر از ۲ دقیقه به‌عنوان واکنش مثبت تلقی شد. سپس آزمایش با آنتی سرم‌های گروه‌های A، B، C و D *سالمونلا* تکرار و گروه‌های سرمی آن‌ها تعیین گردید (۱۷، ۱۸).

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش: به منظور بررسی درصد آلودگی حشرات به باکتری‌ها، جداسازی و شمارش جمعیت باکتری‌ها در سوسک‌های زنده و مرده انجام شد و مقایسه درصد آلودگی سوسک‌ها به باکتری‌های مختلف در مرغداری‌ها از روش تجزیه انحراف لجستیکی با خطای باینومیال (Binomial) در نرم افزار R انجام شد.

جدول ۱. نتایج آزمایش‌های کشت میکروبی و فراوانی باکتری‌های جدا شده از *A. diaperinus*

نمونه	تعداد نمونه کشت شده	موارد مثبت *سالمونلا*		موارد مثبت *پروتئوس*		موارد مثبت *اشرشیاکلی*		موارد مثبت *کلبسیلا*	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
A. diaperinus	۸۰	۳۰	۳۷/۵	۲۲	۲۷/۵	۲۰	۲۵	۸	۱۰

جدول۲. مقایسه میانگین (± خطای استاندارد) درصد آلودگی باکتری‌های مختلف در *A.diaperinus* بین مناطق مختلف.

	میانگین آلودگی منطقه (درصد)				
نوع باکتری	شمال شرقی	جنوب شرقی	شمال غربی	جنوب غربی	
سالمونلا گروه A	۷۰/۴۵±۱/۱۲^{a}	۴۵/۷۵±۱/۵۰^{ab}	۲۴/۶۵±۲/۱۰^{b}	۰۰/۰۰^{c}	(df=۱۲ ، Zvalue=-۰/۹۴ ،P <۰/۰۱)
سالمونلا گروه C	۲۶/۶۷±۲/۱۵^{a}	۰۰/۰۰^{a}	۰۰/۰۰^{a}	۱۵/۵۵±۰/۳۵^{a}	(df=۱۲ ، Zvalue= ۱/۲۲ ،P <۰/۰۱)
پروتئوس	۰۰/۰۰^{c}	۲۸/۰۰±۰/۳۵^{b}	۳۰/۴۵±۱/۸۵^{b}	۵۰/۴۸±۲/۱۲^{a}	(df=۱۲ ، Zvalue=-۱/۰۷ ،P <۰/۰۱)
اشرشیاکلی	۲۶/۱۵±۱/۴۵^{a}	۱۶/۵۰±۰/۵۸^{a}	۲۵/۵۰±۱/۲۳^{a}	۳۵/۱۰±۱/۷۸^{a}	(df=۱۲ ، Zvalue=-۱/۷ ،P <۰/۹۹)
کلبسیلا	۰۰/۰۰^{b}	۰۰/۰۰^{b}	۰۰/۰۰^{b}	۳۲/۱۵±۱/۲۵^{a}	(df=۱۲ ، Zvalue=-۰/۹۴ ،P <۰/۰۱)

مقادیر با حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ دارند.

جدول ۳. مقایسه میانگین (± خطای استاندارد) درصد آلودگی باکتری‌های مختلف در حشرات زنده و مرده *A diaperinus*

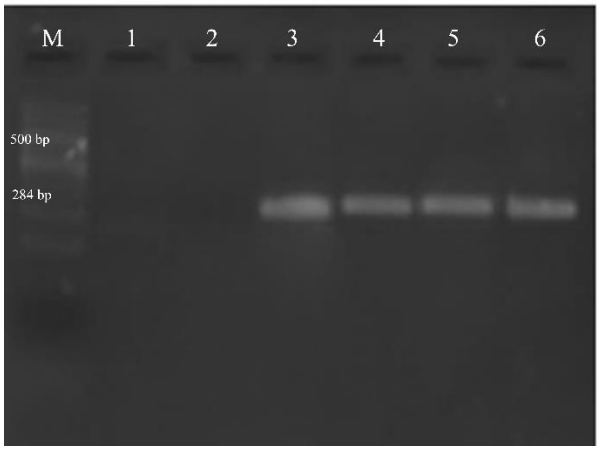
نوع باکتری	حشرات زنده	حشرات مرده	
سالمونلا گروه A	۶۰/۳۵^{a}	۲۱/۶۸ ^{b}	(df=۸ ، Zvalue= -۲/۷۷۶ ،P <۰/۰۱)
سالمونلا گروه C	۱۳/۱۵ ^{a}	۱۱/۳۷ ^{a}	(df= ۸ Zvalue= ۵/۰۳×۱۰$^{-۶}$، P= ۰/۹۹)
پروتئوس	۱۶/۳۱ ^{a}	۱۲/۲۰ ^{a}	(df= ۸ ، Zvalue= -۰/۴۰۶ ،P =۰/۹۹)
اشرشیاکلی	۵۲/۷۵ ^{a}	۱۶/۳۳ ^{b}	(df= ۸ ، Zvalue= -۲/۵۶۹ ،P <۰/۰۵)
کلبسیلا	۵/۱۱ ^{a}	۰۰/۰۰ ^{a}	(df= ۸ ، Zvalue= -۲/۶۳×۱۰$^{-۲۰}$، P =۰/۱۵)

مقادیر با حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ دارند.

نتایج

شناسایی سوسک‌های شب‌رو و مهم‌ترین خصوصیات ریخت‌شناسی و بیولوژیکی آن‌ها: سوسک‌های سیاه شب‌رو جمع‌آوری شده از مرغداری‌های گوشتی همگی به گونه *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) تعلق داشتند و این گونه برای نخستین بار از مرغداری‌های اصفهان گزارش شد. پرورش آزمایشگاهی سوسک شب‌رو جهت مطالعات تاکسنومیکی نشان داد که این‌حشره به شدت نسبت به دما حساس است. به‌طوری که با کاهش درجه حرارت، از تراکم جمعیت آن کاسته شد. همچنین کاهش رطوبت نیز نقش مهمی در کاهش جمعیت آن داشت. از نظر خصوصیات تاکسونومی مشخصه‌های مهم حشره کامل عبارتند از: طول بدن ۵ تا ۷ میلی‌متر، قهوه‌ای مایل به سیاه براق، شاخک‌ها ۱۱بندی با موهای کوتاه زرد رنگ که از بند ششم تا بند دهم، پهن‌تر از سایر بندها مشاهده شد. سر به‌طور عمیق در ناحیه پیشانی از حاشیه جدا شده و در سطح درز پیشانی فرورفتگی‌های ریزی وجود داشت. حاشیه چشم‌ها تقریباً نیمی از طول چشم‌ها را تقسیم کرده بود. سطح بال‌پوش‌ها دارای استری و در ناحیه شکمی زائده خار مانندی در قسمت پرواسترنوم بین پیش‌ران پاهای اول وجود داشت. لاروها دارای بدن بند بند، شکم در انتها باریک، دارای سه جفت پا با سه زائده خار مانند که در ظاهر به کرم‌های دروغی (کاذب) شباهت داشتند. در پرورش آزمایشگاهی، حشره ماده دسته‌های تخم را در شیار کاغذهای سیاه مچاله شده موجود در ظروف پرورش و یا داخل تکه‌های سیب قرار داد. تخم‌ها باریک و در انتها متمایل به گرد، با اندازه ۱ تا ۲ میلی‌متر و به رنگ سفید مایل به قهوه‌ای مشاهده شد. لاروها پس از تفریخ از تخم، شیری رنگ و با افزایش مراحل لاروی به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای مشاهده شدند. شفیره شیری رنگ، پاها در قسمت جانبی بدن دارای چین خوردگی بود. حشره کامل نسل جدید، با بدن نارنجی مایل به قهوه‌ای از حشرات بالغ قابل تفکیک بودند.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های همراه سوسک‌های شب‌رو: نتایج آزمایش‌های جداسازی باکتری‌ها نشان داد از مجموع ۸۰ نمونه کشت داده شده از *A. diaperinus* تعداد ۳۰ نمونه (۳۷/۵ درصد) آلوده به باکتری *سالمونلا*، تعداد ۲۲ نمونه (۲۷/۵ درصد) آلوده به باکتری *پروتئوس*، ۲۰ نمونه (۲۵ درصد) آلوده به باکتری *اشریشیاکلی* و ۸ نمونه (۱۰ درصد) از سوسک‌ها آلوده به باکتری *کلبسیلا* بودند (جدول ۱). در آزمون سرولوژی، جهت شناسایی *سالمونلاهای* گروه سرمی A از آنتی‌سرم O2 و جهت شناسایی گروه سرمی C (C3,C2) از آنتی‌سرم O8 استفاده شد که گروه سرمی A دارای بیشترین فراوانی با ۲۳ نمونه (۷۶/۶۷ درصد) و گروه سرمی C با ۷ نمونه (۲۳/۳۳ درصد) فراوانی کمتری داشت.



تصویر ۱. ژل الکتروفورز *سالمونلا*های جدا شده از سوسک‌های سیاه شب‌رو (*A. diaperinus*). چاهک M: خط‌کش ژنتیکی ۱۰۰ جفت‌باز؛ چاهک ۱: کنترل منفی شامل مخلوط واکنش PCR بدون DNAی الگو؛ چاهک ۲: کنترل منفی شامل مخلوط واکنش PCR و DNAی باکتری *Bacillus sp.*؛ چاهک‌های ۳، ۴، ۵ و ۶: ژن *invA* با اندازه ۲۸۴ جفت‌باز از جدایه‌های *سالمونلا*.

در آزمون PCR جهت شناسایی جدایه‌های سالمونلا، آغازگرهای اختصاصی قطعه DNA مربوط به ژن *invA* به اندازه ۲۸۴ جفت باز را تکثیر کردند (تصویر ۱) که تأییدکننده جنس *سالمونلا* می‌باشد.

درصد آلودگی باکتری‌های مختلف در مناطق مختلف جغرافیایی: از نظر پراکنش گروه‌های سرمی *سالمونلا* در مرغداری‌های مورد بررسی، بیشترین درصد آلودگی به باکتری *سالمونلا* گروه A با فاصله اطمینان ۹۵ درصد، در مرغداری‌های منطقه شمال شرقی با ۷۰ درصد فراوانی مشاهده شد. همچنین درصد آلودگی سایر مناطق به گروه سرمی A به ترتیب در منطقه شمال غربی (۴۵ درصد)، جنوب شرقی (۲۴ درصد) و جنوب غربی (صفر درصد) بود (جدول ۲).

مقایسه میانگین درصد آلودگی مناطق مختلف به *سالمونلا* گروه A نشان داد که بین مرغداری‌ها در مناطق مختلف نمونه‌برداری در سطح احتمال ۱ درصد ($P<۰/۰۱$، Zvalue=-۱/۲۲، df=۱۲) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین نشان داد که درصد آلودگی *سالمونلا* گروه C در مناطق مختلف از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P=۰/۹۹$، Zvalue=-۱/۷۳، df=۱۲) (جدول ۲). همچنین درصد آلودگی مرغداری‌های مناطق مختلف به باکتری *پروتئوس* در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P<۰/۰۱$، Zvalue=-۱/۰۷، df=۱۲) و درصد آلودگی به *اشریشیاکلی* در این مناطق معنی‌دار نشد. نکته جالب توجه این‌که فقط مرغداری‌های منطقه جنوب غربی آلوده به باکتری *کلبسیلا* بودند؛ در دیگر مناطق این باکتری مشاهده نشد (جدول ۲).

تأثیر زنده و مرده بودن سوسک‌های شب‌رو بر درصد آلودگی به باکتری‌ها: نتایج آزمون مقایسه میانگین نشان داد که زنده یا مرده بودن سوسک‌های *A. diaperinus* تأثیر معنی‌دار بر درصد آلودگی به باکتری *سالمونلا* گروه A دارد. به‌طوری که میزان آلودگی به این باکتری در حشرات زنده و مرده به ترتیب ۶۰ و ۲۰ درصد بود ($P<۰/۰۱$، Zvalue=-۲/۷۷، df=۸). همچنین تأثیر زنده و مرده بودن حشرات بر درصد آلودگی به باکتری‌های *سالمونلا* C، *پروتئوس* و *کلبسیلا* در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود (جدول ۳). از طرف دیگر میزان درصد آلودگی سوسک‌های شب‌رو زنده به باکتری *اشریشیاکلی* بیش از سه برابر سوسک‌های مرده بود و اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد نشان داد ($P<۰/۰۱$، Zvalue=-۲/۵۶، df=۸).

بحث

بیماری‌های ناشی از *سالمونلا* گسترش جهانی داشته که نه تنها در کشورهای در حال توسعه، بلکه در کشورهای پیشرفته نیز یک مشکل اساسی و با اهمیت زیاد می‌باشد. گستردگی میزبان‌ها، تعدد سروتایپ‌ها و وجود حاملین طبیعی باعث شده که بیماری سالمونلوز از همه بیماری‌های میکروبی ناشی از مواد غذایی، شایع‌تر بوده و طیور و فرآورده‌های آن‌ها مهم‌ترین منابع انتقال سروتایپ گروه

پاراتیفوئید و ایجاد مسمومیت‌های غذایی می‌باشند (۲۲). لذا شناسایی و کنترل *سالمونلا* از نظر بهداشت عمومی، اهمیت فراوانی دارد و علیرغم پیشرفت‌های بهداشتی، هنوز به‌عنوان یک معضل در صنعت مرغداری به حساب می‌آید (۲۳، ۲۴). استان اصفهان دومین تولید کننده مرغ گوشتی و تخم‌گذار در کشور می‌باشد که توجه به آلودگی‌های میکروبی در مرغداری‌های این استان که تولید طیور و فرآورده‌های آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند از اهمیت بالایی برخوردار است.

مطالعات مختلفی در مورد سوسک‌های سیاه شب‌رو، به‌عنوان مخزن بیماری‌های مختلف در مرغداری‌ها انجام شده است (۳، ۸، ۱۲). بررسی‌های Goodwin و Waltman در سال ۱۹۹۶روی سوسک سیاه بستر نشان داد این حشره به عنوان مخزن بیماری‌های ایمریا، ویروس‌ها و باکتری‌ها از مرغداری‌های صنعتی گزارش شد و تکثیر عوامل بیماریزا در دستگاه گوارش سوسک‌ها به‌طور غیرمنتظره‌ای بالا بود (۵، ۲۵). Agabou و Alloui در سال ۲۰۰۸ توان بالقوه *A.diaperinus* را به عنوان مخزن آلودگی و بیماری‌های باکتریایی مختلف، روی بلدرچین مورد ارزیابی قرار دادند و در حشرات کامل، بیشترین پاتوژن‌ها، شامل باکتری‌های گرم منفی، استرپتوکوک‌ها، کلی‌فرم گزارش شد و از سوسک‌های جمع‌آوری شده از هفت مرغداری مورد بررسی گروه‌های D و C1 سالمونلا شناسایی شدند (۲). در مطالعه حاضر جمعیت بالایی از سوسک‌های سیاه شب‌رو در مرغداری‌های مورد بررسی مشاهده شد که تمام نمونه‌های حشرات کامل جمع‌آوری شده از ۱۶ مرغداری، به گونه *A. diaperinus* تعلق داشتند. براساس آزمایشات باکتری‌شناسی، چهار جنس باکتری از خانواده انتروباکتریاسه شامل *سالمونلا*، *کلبسیلا*، *پروتئوس* و *اشریشیاکلی* از سوسک‌های سیاه شب‌رو جداسازی و شناسایی شدند که بیانگر نقش این حشرات در ماندگاری آلودگی‌های میکروبی مرغداری‌ها می‌باشد. با توجه به این‌که ژن کروموزومی *invA* یکی از مناسب‌ترین توالی‌های اختصاصی برای شناسایی *سالمونلاها* در نمونه‌های بالینی و مواد غذایی آلوده می‌باشد، در این مطالعه جهت شناسایی تکمیلی *سالمونلاهای* جدا شده از طیور، از آغازگرهای اختصاصی این ژن در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی استفاده شد که قطعه DNA به اندازه ۲۸۴ جفت باز توسط این آغازگرها تکثیر شد که با مطالعات پیشین مطابقت دارد (۱۸-۲۰).

بیشترین فراوانی باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش سوسک‌های مورد بررسی مربوط به باکتری *سالمونلا* و گروه‌های سرمی A و C2 در مرغداری‌های منطقه شمال شرقی شهرستان اصفهان به‌دست آمد که با شیوع ۱۵ تا ۲۰ درصدی آلودگی به *سالمونلا* در مرغداری‌های این منطقه و عدم رعایت اصول بهداشتی در اکثر این مرغداری‌ها هم‌خوانی داشت. مطالعه Leffer و همکاران در سال ۲۰۰۲، نشان داد که *A. diaperinus* به‌عنوان ناقل *سالمونلا* روی جوجه‌های پرورشی می‌باشد و تغذیه جوجه‌ها با حشره کامل و لارو مبتلا به *سالمونلا تیفی‌موریوم*، باعث بروز آلودگی بین ۴۵ تا ۵۸ درصد در سه هفته و ۱۱ تا ۲۷ درصد بعد از شش هفته مشاهده شد. این محققین بیان کردند که آلوده شدن جوجه‌ها با تغذیه از این حشرات، می‌تواند بیماری‌ها را به سایر جوجه‌های گوشتی از طریق مدفوع منتقل کنند (۲۶).

شرایط محیطی روی توزیع فضایی و نوسانات جمعی سوسک‌های سیاه شب‌رو تأثیر می‌گذارد. دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۶ الی ۹۰ درصد در دوره‌های پرورشی جوجه‌های گوشتی، برای تکمیل چرخه زندگی آفت مناسب می‌باشد که تنظیم شرایط محیطی مزارع پرورش طیور نقش مهمی در کنترل این آفت دارد (۱۰). ۷۰ درصد جمعیت این سوسک در درزها و دیوارها و ۳۰ درصد در مرکز سالن، وجود دارد که در مطالعه صورت گرفته در اجرای برنامه‌های کنترل با سموم شیمیایی کاربرد دارد (۲۷). Hazeleger و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که *A. diaperinus* آلوده به *سالمونلا پاراتیفی* B واریته جاوا و *کمپیلو باکتر ججونی* می‌باشند که از ۵۰ تا ۱۰۰ درصد از طریق تغذیه به گله‌های طیور، قابل انتقال است (۳).

مطالعه Akbarmehr در سال ۲۰۱۱ نشان داد از مجموع ۵۲۰ نمونه روده طیور مورد بررسی، تعداد ۴۵ نمونه (۸/۶۵ درصد) از نظر آلودگی به *سالمونلا* دارای نتایج مثبت بودند و پس از تعیین گروه سرمی، سالمونلاهای جدا شده در ۴ گروه سرمی D، B، C1 و C2 طبقه‌بندی شدند که گروه سرمی D1 دارای بیشترین فراوانی (۵۳/۳ درصد) بود (۲۸). در مطالعه حاضر با استفاده از روش سرولوژیکی سرو گروه‌های *سالمونلا* در *A. diaperinus* با دو سرو گروه A و C مورد شناسایی قرار گرفت و در میان نمونه‌های *سالمونلا* جدا شده *سالمونلا گالیناروم* و *پلوروم* از گونه‌های اختصاصی طیور در سروگروه D1 مشاهده نشد.

همچنین در این مطالعه باکتری *سالمونلا* گروه A بیشترین درصد آلودگی را در نمونه‌های زنده و مرده سوسک‌های سیاه داشتند و آلودگی *اشرشیاکلی* در حشرات مرده با ۵۲ درصد آلودگی پس از *سالمونلا* A بیشتر از دیگر باکتری‌های جدا شده مشاهده شد. علاوه بر این بین حشرات مرده و زنده در آلودگی به *سالمونلا* گروه A اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ولی در نمونه‌های زنده و مرده حشره ناقل در میزان آلودگی به *سالمونلا* گروه C اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از آنجایی که این سوسک‌ها به‌طور مستقیم مورد تغذیه جوجه‌ها و مرغ‌های پرورشی قرار می‌گیرند، وجود باکتری‌ها در بدن سوسک‌ها، که حتی بعد از مردن حشره نیز آلودگی در بدن آن‌ها باقی می‌ماند، می‌تواند منبع مهم آلودگی‌های میکروبی در طیور پرورشی باشد. این واقعیت که باکتری *سالمونلا* می‌تواند در چرخه‌های متوالی پرورش جوجه‌های گوشتی از طریق سوسک‌های زنده و مرده و همچنین لاروهای آن‌ها منتقل شوند، نشان می‌دهد که باید برنامه‌های منظم کنترل برای حذف این حشرات از مزارع پرورش جوجه‌های گوشتی وجود داشته باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: عفونت *سالمونلا* به دلیل ایجاد بیماری و بروز تلفات و کاهش کارایی ناشی از عفونت در پرندگان همچنان یکی از چالش‌های اصلی صنعت طیور می‌باشد. همچنین مهم‌ترین منبع عفونت‌های *سالمونلا* در انسان، محصولات و فرآورده‌های طیور است که اغلب از حیوانات ظاهراً سالم تهیه می‌شود. بنابراین کاهش *سالمونلا* در مزارع پرورش جوجه‌های گوشتی برای کمک به ایمنی و سلامت غذا از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به این موضوع، صنعت طیور به دنبال راهبردهای جدیدی برای کنترل حضور *سالمونلا* در زنجیره تولید طیور بوده است (۲۹). در این بین حضور حشرات آفت که علاوه بر خسارت مستقیم به مزارع پرورشی طیور، نقش کلیدی در نگهداری و انتقال آلودگی‌های میکروبی مانند *سالمونلا* دارند، از اهمیت ویژه برخوردار است. در مطالعه حاضر برای نخستین بار سوسک سیاه شب‌رو *A. diaperinus* به‌عنوان یکی از مخازن آلودگی باکتری *سالمونلا* در مرغداری‌های گوشتی شهرستان اصفهان جداسازی و شناسایی شد که آلودگی نسبتاً بالای این حشرات به باکتری *سالمونلا* به‌ویژه گروه سرمی A، که از سروتیپ‌های بیماریزا در انسان و طیور می‌باشد، به تأیید رسید. بررسی درصد آلودگی در مرغداری‌های مناطق مختلف نیز بیانگر پراکنش زیاد این باکتری در مرغداری‌های مورد بررسی بوده که می‌تواند تهدیدی برای این صنعت در منطقه باشد و باید توجه بیشتری به اقدامات کنترلی و بهداشتی در این مزارع داشت.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری پژوهشگاه مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان بخاطر مساعدت در تهیه مواد و امکانات مطالعه حاضر کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند. همچنین از مساعدت‌های دکتر اتو مرکل، موزه تاریخ طبیعی بوداپست مجارستان، بخاطر تأیید گونه حشرات مورد مطالعه قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Tavasoli M, Allymehr M, Oftad H. Prevalence of coleopteran species in the litter of commercially reared birds. Int J Vet Res. 2011;4:232-238. doi: 10.22059/ijvm.2011.23579

2. Agabou A, Alloui N. Spatial distribution and population fluctuation of Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) during flock raised in broiler houses in the north east of Algeria. Academ J Entomol. 2009;2:88-91.

3. Hazeleger W, Bolder N, Beumer R, Jacobs-Reitsma W. Darkling beetle (Alphitobius diaperinus) and their larvae as potential vectors for the transfer of campylobacter jejuni and salmonella enteric servor paratiphi B variant java between successive broiler flocks. Appl Environ Microbiol. 2008;74:6887-6891. doi: 10.1128/AEM.00451-08

4. Alborzi AR, Rahbar A. Introducing Alphitobius diaperinus, (Coleptera: Tenebrionidae) as a intermediate host of Hadjelia truncate (Nematoda). Iranian J parasitol. 2012;7:92-98.

5. Donoso A, Paredes N, Retamal P. Detection of Antimicrobial Resistant Salmonella enterica Strains in Larval and Adult Forms of Lesser Mealworm (Alphitobius diaperinus) From Industrial Poultry Farms. Front Vet Sci. 2020;7:577848. doi: 10.3389/fvets.2020.577848

6. Hosen M, Khan A, Hossain M. Growth and development of the lesser mealworm, Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) on cereal flours. Pakistan J Biol Sci. 2004;7:1505-1508.

7. Tavassoli M, Allymehr M, Oftad H. Prevalence of coleopteran species in the litter on commercially reared birds. Int J Vet Res. 2011;5:232-238. doi: 10.22059/ijvm.2011.23579

8. Renault D, Colinet H. Differences in the Susceptibility to Commercial Insecticides among Populations of the Lesser Mealworm Alphitobius diaperinus Collected from Poultry Houses in France. Insects 2021;12,309. doi: 10.3390/insects12040309

9. Crouch CF, Pugh C, Patel A, Brink H, Wharmby C, Watts A, van Hulten MCW, de Vries SPW. reduction in intestinal colonization and invasion of internal organs after challenge by homologous and heterologous serovars of Salmonella enterica following vaccination of chickens with a novel trivalent inactivated Salmonella vaccine. Avian Pathol. 2020;49:666-677. doi: 10.1080/03079457.2020.1814200

10. Sammarco BC, Hinkle NC, Crossley MS. Biology and management of lesser mealworm Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) in broiler houses. J Integr Pest Manag. 2023;14(1):1-8. doi: 10.1093/jipm/pmad003

11. Abatcha MG, Goni MD, Abbas MA, Jalo IM, Mohammed G. A review of Listeria and Salmonella: An update on description, characteristics, incidence, and antibiotic susceptibility. Adv Anim Vet Sci. 2020;8:1232-1249.

12. Roche A, Cox NA, Richardson LJ, Cason JA, Fairchild BD, Hinkle NC. Transmission of salmonella to broiler by contaminated larval and adult lesser mealworm Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae). Poult Sci.2009;88:44-48.

13. Strother KO, Steelman DC, Gbur EE. Reservoir competence of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for Campylobacter jejuni (Campylobacterales: Campylobacteraceae). J Med Entomol. 2005;42(1):42-7. doi: 10.1093/jmedent/42.1.42 PMID: 15691007

14. Borrer DJ, Triplehorn CA, Johanson NF. An introduction to the study of insects. 7th ed. Peter Marshall. Colorado, USA; 2005.864p.

15. Choat PM. Introduction to the identification of beetles (Coleoptera). Dichotomous Keys to Some Families of Florida Coleoptera. 3th ed. Cambridge University Press. Cambridge, USA; 2003.p.23-33.

16. Akbar A, Kumar AA. Isolation of Salmonella from ready to eat poultry meat and evaluation of its survival at low temperature, microwaving and simulated gastric fluids. J Food Sci Technol. 2015;52(5):3051-3057. doi: 10.1007/s13197-014-1354-2 PMID: 25892808

17. Xin W, Honglin W, Tingting L, Feifei L, Yiluo C, Xiaodong G, Guoyuan W, Qingping L, Huabin S, Zishu P, Zhang T. Characterization of Salmonella spp. Isolated from chickens in Central China. BMC Vet Res. 2020;16:299. doi: 10.1186/s12917-020-02513-1

18. Ghafari H, Zahraei Salehi T, Moosakhani F. Identification of Salmonella Isolated from Dairy Farms in Tehran and Alborz Provinces by Classical and Molecular Methods. J Vet Res. 2021;75(4):529-536. doi: 10.22059/JVR.2020.232882.2626

19. Rahn K, DeGrandis SA, Clarke RC, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an invA gene sequence of Salmonalla typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cell Probes. 1992;6:271-279. doi: 10.1016/0890-8508(92)90002-F

20. Shanmugasamy M, Velayutham T, Rajeswar J. InvA gene specific PCR for detection of Salmonella from broilers. Vet World. 2011;4(12):562-564. doi: 10.5455/vetworld.2011.562-564

21. Alzwghaibi A, Yahyaraeyat R, Nayeri Fasaei B, Ghalyanchi Langeroudi A, Zahraei Salehi T. Identification and Discrimination of Salmonella Enteritidis, S. Pullorum, S. Gallinarum and S. Dublin Using Salmonella Specific Genomic Regions Amplification Assay. Iran J Vet Med. 2019;13(2):131-142. doi: 10.22059/IJVM.2019.259712.1004902

22. Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. Worldwide Epidemiology of Salmonella serovars in animal-based foods: A meta-analysis. Appl Environ Microbiol. 2019;85:e00591-19. doi: 10.1128/AEM.00591-19 PMID: 31053586

23. TerVeen C, Feberwee A, Augustijn M, deWit S. High specificity of the Salmonella Pullorum/Gallinarum rapid plate agglutination test despite vaccinations against Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium. Avian Pathol. 2021;1-7. doi: 10.1080/03079457.2021.1990854 PMID: 34633242

24. Arya G, Holtslander R, Robertson J, Yoshida C, Harris J, Parmley J, Nichani A, Johnson R, Poppe C. Epidemiology, pathogenesis, genoserotyping, antimicrobial resistance, and prevention and control of non-typhoidal Salmonella serovars. Curr Clin Microbiol Rep. 2017;4:43-53. doi: 10.1017/S0950268813001659 PMID: 23842508

25. Goodwin M, Waltman W. Transmission of Eimeria, Viruses and Bacteria to Chicks: Darkling Beetles (Alphitobius diaperinus) as Vectors of Pathogens. J Appl Poult Res. 1996;5:51-55.

26. Leffer AM, Biesdorf SM, De Almedia LM, Leffer EVB, Vigen P. Isolation of enteric and litter organism from Alphitobius diaperinus in brooder chicken houses in west of Parana state brazil. Rev Braza Decie Vic. 2002;4:243-247.

27. Tomberlin J, Richman D, Meyers H. Suscptibility of Alphitobius diaperinus (Coleoptera: Tenebrionidae) from broiler facilities in Texas to four insecticides. J Econ Entomol. 2008;101(2):480-483.

28. Akbarmehr J. Determining the serogroups of Salmonella isolated from poultry and identifying the hilA gene by PCR method. Microb Biotechnol. 2011;6:33-38. doi: 10.1590/S1678-9946201961036 PMID: 31340248

29. Mohamed T, Salem HM, El-Tahan AM, El-Mageed TA, M. Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed E. The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview. Poult Sci. 2022;101:101716. doi: 10.1016/j.psj.2022.101716 PMID: 35176704