

شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر از پوست مرغ با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت باکتریایی و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

فاطمه ابراهیمی لقا^{۱*}، فریبا زینالی^۲، محمود رضازاد باری^۲

(۱) دانش آموخته صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(۲) گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(دریافت مقاله: ۱۰ شهریور ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱ آذر ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: عفونت‌های غذایی ناشی از کمپیلوباکتر یکی از عوامل گسترده التهابات معدی-روده‌ای در انسان می‌باشد که از نظر مسایل بهداشتی و زبان‌های اقتصادی در جامعه حائز اهمیت می‌باشد. **هدف:** بررسی شیوع آلودگی کمپیلوباکتر در نمونه‌های پوست مرغ‌های ارومیه، با استفاده از روش‌های کشت باکتریایی و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشد. **روش کار:** ۸۰ نمونه پوست مرغ از کشتارگاه پروتئین گستر سینا واقع در ارومیه به تعداد مساوی در طول فصل‌های زمستان و بهار جمع آوری شدند. قدرت زنده مانی کمپیلوباکتر بعد از ۲۴ ساعت نگهداری نمونه‌ها در شرایط یخچالی بررسی شد. نمونه‌های مثبت جهت استخراج DNA و انجام PCR مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌ها، نمونه‌های مثبت PCR، توالی یابی شدند. **نتایج:** ۵۸/۷۵٪ از نمونه‌های پوست مرغ با استفاده از روش‌های کشت‌های باکتریایی، کمپیلوباکتر مثبت تشخیص داده شدند. نتایج مطالعه قدرت زنده مانی کمپیلوباکتر در شرایط سرد بعد از ۲۴ ساعت، نشان داد که کاهش قدرت زنده مانی کمپیلوباکتر معنی‌دار نبوده و همچنین میزان آلودگی نمونه‌ها در فصل بهار بطور معنی‌داری بالاتر از فصل زمستان بود که ممکن است به دلیل بالا بودن درجه حرارت محیط و ایجاد شرایط مناسب برای کمپیلوباکتر باشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** پوست مرغ از مخازن مهم کمپیلوباکتر بوده و این موضوع از لحاظ کنترل رعایت بهداشت عمومی در کلیه مراحل تولید تا عرضه محصولات طیور و همچنین انتقال آن به سایر قسمت‌های لاشه مرغ باید مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پوست مرغ، کمپیلوباکتر، کشت‌های باکتریایی، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

مقدمه

تهیه‌ی غذا، تقاضای زیاد مصرف کنندگان و غنی بودن از پروتئین (۲۳-۲۰٪) با هزینه معقول می‌باشد (۱، ۲۵، ۲۸). دوز عفونی این باکتری، بسیار پایین است (۵۰۰ CFU/g)، که بستگی به سن و شرایط فیزیکی فرد دارد، در کودکان این دوز ممکن است به طور قابل توجهی کمتر باشد (۱۷). مهم‌ترین منابع آلودگی عبارتند از شیر خام، گوشت و محصولات مرغ، گوشت چرخ شده که حرارت کافی ندیده و همچنین آب‌های سطحی تصفیه نشده که به مصرف آشامیدن می‌رسد نیز از عوامل ابتلا به عفونت هستند. از جمله راه‌های جلوگیری از شیوع بیماری کنترل بهداشتی آب آشامیدنی، جلوگیری از تماس افراد با دام‌های آلوده و اجتناب از مصرف مواد غذایی با منشأ دامی خام می‌باشد (۶). هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های کمپیلوباکتر از نمونه‌های پوست مرغ بعد از مرحله شستشو، بر اساس تکنیک‌های فنوتیپی مبتنی بر کشت و شناسایی دقیق جنس و گونه‌های کمپیلوباکتر با کمک روش‌های مولکولی و ژن rRNA می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه‌ها: تعداد ۸۰ نمونه پوست مرغ بعد از مرحله شستشو بطور تصادفی از کشتارگاه پروتئین گستر سینا واقع در ارومیه، تهیه شدند (به تعداد مساوی در دو فصل زمستان و بهار). نمونه‌ها با استفاده از ظروف

بیماری‌های منتقله از مواد غذایی از علل اصلی گاستروانتریت انسان بوده و در میان عوامل باکتریایی، گونه‌های کمپیلوباکتر به خصوص کمپیلوباکتر ژژونی و کلی، اغلب عامل عمده التهابات معدی-روده‌ای در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شود (۹، ۱۰). بطوری که در میان گونه‌هایی که باعث اسهال می‌شوند، اغلب گونه کمپیلوباکتر ژژونی (۹۳٪) و پس از آن کمپیلوباکتر کلی (۷٪)، کمپیلوباکتر لاری و کمپیلوباکتر هیواپنتستینالیس جدا شده است (۷). کمپیلوباکترها غالباً در دستگاه گوارش حیوانات، به ویژه پرندگان یافت می‌شوند و معمولاً محیط زیست، از جمله آب را آلوده می‌کنند. کمپیلوباکتر بوزیس در انسان بوسیله گونه‌های گرما دوست ایجاد می‌شود بطوریکه اخیراً کمپیلوباکتر ژژونی از گونه‌های سالمونلا پیشی گرفته و عامل عمده بیماری‌های باکتریایی منتقله از غذا در اتحادیه اروپا گزارش شده است (۱۱). شیوع گونه‌های کمپیلوباکتر در محصولات مرغ خام در دامنه ۰ تا ۱۰۰٪ و بطور متوسط ۶۲٪ است (۳) بطوری که گزارش‌های اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که گوشت و محصولات مرغ هنوز عامل اصلی بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در انسان است (۱۸) از طرفی تولید و مصرف محصولات مرغ، روند رو به رشدی در سراسر جهان نشان می‌دهد (۱۸) که این افزایش عمدتاً به دلایلی از قبیل کم بودن هزینه‌های تولید گوشت مرغ در مقایسه با گوشت گاو، افزایش استفاده در



شناسایی مولکولی کمپیلوباکتر با بکار گیری واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): جفت پرایمر عمومی ژن ۱۶S rRNA
 Reverse-E: AACTGGAGGAAGGTGGGGA, Forward-E: AGGAGGTGATCCAACCGCA
 مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ μl بصورت زیر تهیه شد: PCR Master mix (فرمنتاس آلمان) به میزان ۱۲/۵ μl، از هر پرایمر (سینازن ایران) به میزان ۱ μl، DNA الگو به میزان ۳/۵ μl و آب مقطر استریل به میزان لازم برای رسیدن به حجم نهایی استفاده شد. روش PCR مورد استفاده بصورت زیر بهینه سازی شد: واسرشت اولیه ۴ min در دمای ۹۵°C و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل واسرشت در دمای ۹۵°C به مدت ۴۰ s، امتزاج پرایمرها در ۵۶°C به مدت ۳۰ s و توسعه رشته‌ها در ۷۲°C به مدت ۴۰ s، توسعه نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ min صورت پذیرفت.

الکتروفورز محصولات PCR: پس از انجام واکنش PCR، برای هر واکنش ۳ μl از محصول واکنش به همراه ۱ μl رنگ بارگذاری (فرمنتاس آلمان) و ۲ μl آب مقطر دو بار تقطیر در هر چاهک الکتروفورز بارگذاری شد. در یکی از چاهک‌ها ۱/۵ μl نشانگر یک کیلو جفت باز (فرمنتاس آلمان) و در چاهکی دیگر نیز نمونه‌ی کنترل منفی که فاقد DNA جدایه‌ها بود بارگذاری شدند. الکتروفورز مخلوط‌های بارگذاری شده در ژل آگارز (اینوترژن آمریکا) ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم برماید (تیترا ن ایران) و در بافر TBE 1X با جریان ۷۵ V، به مدت ۲ ساعت انجام پذیرفت. پس از اتمام الکتروفورز از ژل مورد نظر توسط دستگاه ژل داکيومنت (Gel Logic آمریکا) تحت اشعه‌ی ماورا بنفش عکس برداری صورت گرفت.

تعیین توالی جدایه‌ها: پس از ارزیابی صحت انجام واکنش PCR توسط الکتروفورز و مشاهده‌ی باندها در موقعیت ۴۰۰ bp، محصولات واکنش PCR، ۶ ایزوله پوست مرغ جهت تعیین توالی به صورت خوانش یک طرفه از پرایمر Forward-E، به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI)، بلاست شده و مشابه‌ترین سویه به ایزوله‌ی مورد نظر تعیین گردید. تشابه بالای ۹۷٪ به عنوان تشابه معنی‌داری تلقی شد.

آنالیز آماری: کلیه آزمایشات سه بار تکرار گردیدند. برای انجام تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار MSTATC با مقایسه‌ی میانگین‌ها در سطح ۵٪ برای بررسی معنی‌داری میزان آلودگی نمونه‌ها استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان داد که ۵۸/۷۵٪ از نمونه‌های پوست مرغ با استفاده از روش‌های کشت‌های باکتریایی، کمپیلوباکتر مثبت تشخیص داده شدند. شیوع کمپیلوباکتر در نمونه‌ها بالا بود. نتایج بدست آمده از بررسی قدرت زنده مانگی کمپیلوباکتر در نمونه‌های پوست مرغ با میانگین بار میکروبی ۴/۶۸ ± ۰/۷۳۵ cfu/g و در شرایط سرد بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در

استریل جمع آوری و به منظور جلوگیری از آلودگی ثانویه در داخل کیسه حاوی یخ قرار داده شده و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

شناسایی، شمارش و جداسازی کمپیلوباکتر: به منظور غنی‌سازی، رقت ۰/۱ از نمونه‌ها در آب پیتونه بافری (Quelab کانادا) استریل تهیه و بعد از ورتکس مناسب، در دمای ۴۲°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی این مدت، رقت‌های بالاتر، ۵-۱۰ تا ۷-۱۰ تهیه شده و کشت سطحی بر روی محیط کشت کمپیلوباکتر سلکتیو آگار (Quelab کانادا) حاوی مکمل آنتی بیوتیکی کمپیلوباکتر داده شد. بعد از زمان مناسب گرمخانه‌گذاری (۴۲°C به مدت ۲۴ ساعت)، پتری دیش‌هایی که در آن پررنگه باکتری رشد کرده بود، پس از شمارش، از نظر رنگ‌آمیزی گرم و تست حرکت مورد بررسی قرار گرفتند، در صورت مشاهده باکتری میله‌ای خمیده، گرم منفی و متحرک، آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل اکسیداز و کاتالاز نیز انجام شد. مثبت بودن آزمون‌های فوق بر روی پررنگه‌های مورد آزمایش به منزله محتمل بودن حضور کمپیلوباکتر بود. در ادامه به منظور خالص سازی، پررنگه‌ها چندین بار بر روی محیط کشت کمپیلوباکتر سلکتیو آگار کشت خطی داده شدند. پتری دیش‌ها در داخل جار بیهوازی با گاز پک نوع C (مرک آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲°C گرمخانه‌گذاری و به منظور تأیید خلوص رنگ‌آمیزی گرم شد. سپس جهت تأیید قطعی، از تکنیک PCR برای تکثیر قطعه‌ی به اندازه ۱۰۰۴ bp از ژن ۱۶S rRNA استفاده گردید (۱۲). برای تهیه ذخیره باکتریایی، از کشت‌های خطی خالص در محیط کشت کمپیلوباکتر سلکتیو براث تلقیح صورت گرفته و پس از رسیدن به کدورت مطلوب (حدود ۲۴ ساعت)، هر ایزوله در دمای ۴۲°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱ ml از آن در داخل میکروتیوب ml ۱/۵ ریخته شده و به مدت ۱ min با دور ۱۲۰۰۰g×، در دمای ۲۵°C سانتیفریژ (اپندروف آلمان) شد. پس از دور ریختن مایع فوقانی، ۰/۵ ml از سوسپانسیون میکروبی اولیه و ۰/۵ ml از محیط کشت مایع استریل حاوی ۳۰٪ گلیسرول (مرک آلمان)، به میکروتیوب افزوده و پس از اختلاط درون میکروتیوب، در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد.

تهیه DNA جهت PCR: DNA از پررنگه‌هایی که بعنوان کمپیلوباکتر شناسایی شدند به روش جوشاندن استخراج گردید. بدین منظور، پس از فعال‌سازی جدایه‌ها، پررنگه‌های تک در ۴ ml محیط کشت نوترینت براث (Quelab کانادا) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس مایع تلقیح به ۲ تیوب ۲ ml تقسیم و در ۱۰۰۰۰ g× به مدت ۳ min سانتیفریژ شد. پس از حذف مایع فوقانی تیوب‌ها، به یکی از آن‌ها ۱۰۰ μl آب مقطر استریل اضافه و پس از ورتکس، محتویات آن به تیوب دوم انتقال داده شد. محتویات تیوب دوم پس از ورتکس به ترمومیکسر (اپندروف آلمان)، در دمای ۹۹°C به مدت ۶ min منتقل، و در نهایت به مدت ۵ min در ۱۰۰۰۰ g× سانتیفریژ شد. مایع رویی که حاوی DNA بود در آزمایشات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

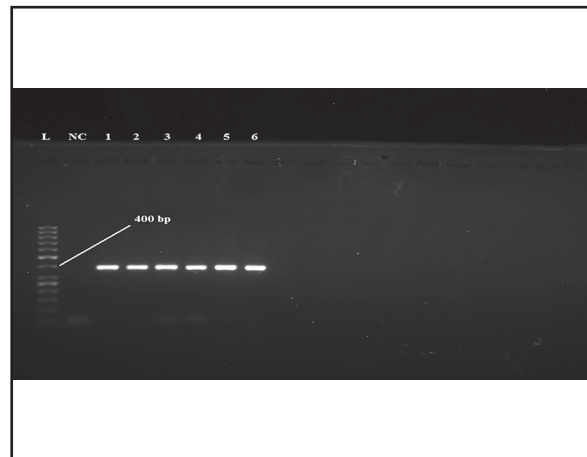


در محیط کشت بودند، مورد آزمایش‌های کاتالاز، اکسیداز و حرکت قرار گرفتند. کلنی‌های مثبت در این آزمایش‌ها نشان دهنده‌ی این بود که این کلنی‌ها کمپیلوباکتر بودند. از آنجایی که کمپیلوباکتر ژرونی، میکروارگانسیم سخت رشد و حساس به تغییرات دما، زمان و اتمسفر گرمخانه‌گذاری بوده (۱۴) و همچنین در غذا و آب، خیلی کمتر از نمونه‌های مدفوعی وجود دارد و حضور آن در غذا ممکن است توسط قرار گرفتن در معرض فرآیندهایی نظیر حرارت، تبرید، فریز کردن یا دیگر شرایط فرآوری و نگهداری آسیب ببیند (۲۳، ۱۳). لذا یک مرحله غنی‌سازی برای تشخیص تعداد کمی از باکتری‌ها و سلول‌های آسیب دیده نیاز است.

پوست مرغ از منابع اصلی کمپیلوباکتر ژرونی در نظر گرفته شده است (۲۳) بطوری که با سواب گرفته شده از پوست مرغ در کشتارگاه‌ها، گونه‌های کمپیلوباکتر در ۷۹٪ از نمونه‌های مرغ در بلژیک و ایالات متحده آمریکا جدا گردید (۴، ۱۵) همچنین در آلمان ۵۸/۱٪، ۷۲/۱٪ و ۲۵/۶٪ (n=۴۳) از نمونه‌های پوست بوقلمون جمع‌آوری شده پس از defeathering, evisceration و خنک کردن به ترتیب برای حضور کمپیلوباکتر ژرونی مثبت بودند (۲).

داده‌های حاصل از شمارش باکتری توسط نرم افزار MSTATC و آزمون t- student نشان داد که میانگین بار میکروبی در نمونه‌های پوست در فصول زمستان و بهار به ترتیب $3/68 \pm 0/187$ cfu/g و $5/52 \pm 0/283$ cfu/g بود، بدین ترتیب میزان آلودگی در فصل بهار بطور معنی‌داری بیشتر از فصل زمستان بود. بالا بودن میزان آلودگی در فصل بهار ممکن است به دلیل بالا بودن درجه حرارت محیط و ایجاد شرایط مناسب برای رشد کمپیلوباکتر باشد.

بررسی قدرت زنده‌مانی کمپیلوباکتر بعد از ۲۴ ساعت نگهداری نمونه‌ها در دمای یخچالی: تعدادی زیادی از مطالعات نشان داده‌اند که کمپیلوباکتر تحت شرایط تنش می‌تواند به حالت زنده اما غیرقابل کشت در بیابند که با روش‌های معمول قابل تشخیص نمی‌باشد (۵، ۱۴). زنده ماندن از طریق تنش‌هایی که در طول نگهداری که نمونه با آن‌ها مواجه می‌شوند، کاهش می‌یابد (۱۶). همینطور زمان نگهداری ممکن است در تعداد قابل تشخیص کمپیلوباکتر در یک نمونه تأثیر بگذارد (۱۶، ۲۳). همچنین وجود فاصله طولانی بین نمونه‌گیری و کشت نیز موجب منفی شدن نتیجه کشت می‌گردد. به عنوان مثال در بررسی Mahendru و همکاران در سال ۱۹۹۷، نتیجه PCR نمونه‌های کشت ماکیان بعد از یک هفته نگهداری در دمای ۴°C مثبت بوده است. در حالی که نتیجه کشت این نمونه‌ها پس از این مدت منفی گشته است. نتایج مطالعات Kovalenko و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که پوست مرغ شامل شایع‌ترین گونه‌های گرما دوست کمپیلوباکتر ژرونی و کلی بوده که مرتبط با بیشترین موارد کمپیلوباکتر یوزیس در انسان است (۸) که مشابه با نتایج این مطالعه بود. PCR: ابتدا DNA جدایه‌های مورد نظر با روش جوشاندن استخراج



تصویر ۱. باندهای ۴۰۰ bp حاصل از تکثیر ژن SrRNA ۱۶، NC: کنترل منفی، L: نشانگر ۵۰، ۶-۱ جدایه‌های پوست.

جدول ۱. نتایج توالی‌یابی rRNA ۱۶S جدایه‌های پوست مرغ.

Isolate Code	Name of Bacteria	ID in% NCBI	Accession Number
a1	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	۹۸	AF55۰۶۲۹/۱
a2	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	۱۰۰	AF55۰۶۲۹/۱
a3	<i>Campylobacter lari</i> RM۲۱۰۰ ۱۰۶۰D-ATCC BAA strain RM۲۱۰۰	۱۰۰	NR۰۷۴۵۵۵/۱
a4	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	۹۹	AF55۰۶۲۹/۱
a5	<i>Campylobacter coli</i> strain X3	۹۸	GQ۱۶۷۶۷۲۱
a6	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ATCC۰۰۸۱۹ ۱۱۱۶۸ <i>jejuni</i> NCTC ۱۱۱۶۸ strain NCTC	۹۹	NR۰۷۴۵۵۰/۱

دمای یخچالی با میانگین بار میکروبی $2/4 \pm 0/619$ cfu/g، نشان داد تعداد باکتری‌ها کاهش قابل توجهی نداشته و کاهش قدرت زنده‌مانی معنی‌دار نبود. نتایج حاصل از توالی‌یابی، ۶۶/۶٪ کمپیلوباکتر ژرونی، ۱۶/۶٪ کمپیلوباکتر کلی و ۱۶/۶٪ کمپیلوباکتر لاری را در پوست مرغ تشخیص داده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بالاترین آلودگی مربوط به کمپیلوباکتر ژرونی است که همواره بعنوان شایع‌ترین گونه بازیافت شده از گوشت و محصولات مرغ گزارش شده است (۲۷، ۲۹). میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژرونی تا ۱۰۰٪ در مرغ و بوقلمون تازه ذبح شده نیز گزارش شده است (۳، ۲۶).

بحث

تعداد ۸۰ نمونه پوست مرغ که از کشتارگاه نمونه برداری و جهت جداسازی از محیط کشت کمپیلوباکتر سلکتیو آگار بعد از یک مرحله غنی‌سازی استفاده گردید، کلنی‌هایی که به رنگ کرم، مرطوب، محدب و قطر کمتر از ۲mm و حاوی باکتری‌های گرم منفی و منحنی شکل



References

1. Al- Dughaym, A., Al- Tabari, G. (2010) Safety and quality of some chicken meat products in Al-Ahsa markets- Saudi Arabia. J Biologic Sci. 17: 37-42.
2. Alter, T., Gaull, F., Froeb, A., Fehlhaber, K. (2005) Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. Food Microbiol. 22: 345-351.
3. Arritt, F.M., Eifert, J.D., Pierson, M.D., Sumner, S.S. (2002) Efficacy of Anti microbials against *Campylobacter jejuni* on Chicken Breast Skin. J Appl Poult Res. 11: 358-366.
4. Berrang, M.E., Buhr, R.J., Cason, J.A., Dickens, J.A. (2001) Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. J Food Prot. 64: 2063-2066.
5. Beumer, R.R., De Vries, J., Rombouts, F.M. (1992) *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. Int J Food Microbiol. 15: 153-163.
6. Bolster, C.H., Walker, S.L., Cook, K.L. (2006) Comparison of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* transport in saturated porous media. J Environ Qual. 35: 1018-1025.
7. Brown, P.E., Christensen, O.F., Clough, H.E., Diggle, P.J., Hart, C.A., Hazel, S., Kemp, R., Leatherbarrow, A.J.H., Mooke, A., Sutherst, J., Turner, J., Williams, N.J., Wright, E.J., French, N.P. (2004) Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol. 70: 6501-6511.
8. European Food Safety Authority Journal. (EFSA) (2011) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal. 9: 2105.
9. Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C., Tauxe, R.V. (2000) In: American Society for Microbiology, *Campylobacter*. Nachamkin, I., Blaser, M.J. (eds.). (2nd ed.) Washington, DC. p. 121-138.
10. Frost, J.A. (2001) Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement.

شد. در مرحله بعد با کمک پرایمرهای عمومی Forward-E و Reverse-E تکثیر ژن ۱۶SrRNA، با استفاده از دستگاه مستر سایکلیر گردادیانت (اپندروف آلمان) انجام پذیرفت. تصویر ۱، پروفایل‌های باندی مربوط به سویه‌های مختلف مورد آزمون را نشان می‌دهد. طول قطعه مورد نظر ۴۰۰bp می‌باشد. همان‌گونه که در شکل مشخص می‌باشد، مکان قرارگیری باندها، با توجه به نردبان مورد استفاده، که از نوع Generler ۵۰bp بود و طول قطعات را تا ۱۰۰۰bp نشان می‌داد، دقیقاً همان طول قطعه را نشان می‌دهد، که نشان دهنده صحیح بودن مراحل انجام آزمون می‌باشد.

در تمامی مراحل مربوط به PCR ژن ۱۶SrRNA، از شاهد که در علم مولکولی کنترل منفی نامیده می‌شود، استفاده شد. نمونه کنترل منفی دارای تمامی مخلوط‌های شرکت کننده در واکنش PCR بجز DNA مربوط به رشته الگو می‌باشد، آمپلیکون مربوط به نمونه کنترل منفی باید در هنگام الکتروفورز و مشاهده در زیر نور UV، فاقد الگوی باندی باشد. هرچند سیکل‌های دمایی برای میکروتیوب مربوط به نمونه کنترل منفی طی شده است، اما به دلیل نبودن رشته الگو، رشته‌ای جدید ایجاد نشده است.

سکانسینگ: پس از اتمام عملیات PCR، محصولات واکنش جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. نتایج حاصل از توالی‌یابی در جدول ۱ ارائه شده است. نمونه‌های a1 تا a6 جدایه‌های پوست مرغ می‌باشد.

نتیجه گیری نهایی: نتایج نشان داد که پوست مرغ از مخازن مهم کمپیلوباکتر بوده و این موضوع از لحاظ کنترل رعایت بهداشت عمومی در کلیه مراحل تولید تا عرضه محصولات طیور و همچنین انتقال آن به سایر قسمت‌های لاشه مرغ باید مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم پژوهشکده زیست و فناوری و آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه صنایع غذایی دانشگاه ارومیه که این پژوهش در آنجا اجرا گردیده کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

30: 85S-95S.

11. Gunther, N.W., Chen, C.Y. (2009) The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. Food Microbiol. 26: 44-51.
12. Hosseinzadeh, S., Mardani, K., Aliakbarlu, J., Ghorbanzadehghan, M. (2014) Occurrence of *Campylobacter* in chicken wings marketed in the northwest of Iran. Int Food Res J. 22: 41-45.
13. Humphrey, T.J., Cruickshank, J.G. (1985) Antibiotic and deoxycholate resistance in *Campylobacter jejuni* following freezing or heating. J



- Appl Bacteriol. 59: 65-71.
14. Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M. (2007) Review article: Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. Int J Food Microbiol. 117: 237-257.
 15. Jeffrey, J.S., Tanooka, K.H., Lozanot, J. (2001) Prevalence of *Campylobacter* spp. from skin, crop and intestine of commercial broiler chicken carcasses at processing. Poult Sci. 80: 1390-1392.
 16. Karenlampi, R., Hanninen, M.L. (2004) Survival of *Campylobacter jejuni* on various fresh produce. Int J Food Microbiol. 97: 187-195.
 17. Kothary, M.H., Buba, U.S. (2001) Infective dose of food borne pathogens in volunteers: A review. J Food Saf. 21: 49-73.
 18. Kozacinski, L., Hadziosmanovic, M., Zdolec, N. (2006) Microbiological quality of poultry meat on the Croatian market, Vetrinarski Arhiv. J Facul Vet Med. 76: 305-13.
 19. Kovalenko, K., Roasto, M., Liepin, S.E., Mäesaar, M., Hörman, A. (2013) High occurrence of *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production. Food Control. 29: 188-191.
 20. Liu, D. (2008) Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. Int J Food Microbiol. 122: 229-242.
 21. Mahendru, M., Prasad, K.N., Dhole, T.N., Ayyagari, A. (1997) Rapid identification of *Campylobacter jejuni* strains by polymerase chain reaction and their restriction fragment length polymorphism analysis. Indian J Med Res. 105: 9-14.
 22. Musgrove, M.T., Cason, J.A., Feletecher, D.L., Stern, N.J., Cox, N.A., Bailey, J. (1997) Effect of cloacal plugging on microbial recovery from partially processed broilers. Poult Sci. 76: 530-533.
 23. Rodgers, J.D., Clifton-Hadley, F.A., Marin, C., Vidal, A.B. (2010) An evaluation of survival and detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler caecal contents using culture-based methods. J Appl Microbiol. 109: 1244-1252.
 24. Rosenquist, H., Sommer, H.M., Nielsen, N.L., Christensen, B.B. (2006) The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. Int J Food Microbiol. 108: 226-232.
 25. Sampers, I., Habib, I., Berkvens, D., Dumoulin, A., De Zutter, L., Uyttendaele, M. (2008) Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. Int J Food Microbiol. 128: 297-303.
 26. Son, I., Engien, M.D., Berrabg, M.E., Fedorka-Cary, P.J., Harrison, M.A. (2007) Prevalence of *Acrobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. Int J Food Microbiol. 113: 16-22.
 27. Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Bailey, J.S., Cox, N.A., Craven, S.E., Hiatt, K.L. (2001) Distribution of *Campylobacter* spp. in selected US poultry production and processing operation. J Appl Microbiol. 64: 1705-1710.
 28. Vandeplas, S., Marcq, C., Dubois, R., Beckers, Y., Thonart, P., Th'ewis, A. (2008) Contamination of poultry flocks by the human pathogen *Campylobacter* spp. and strategies to reduce its prevalence at the farm level. Biotechnologie, Agronomie, Soci' et' e et Environnement. 3: 317-34.
 29. Wallace, J.S., Stanley, K.N., Jones, K. (1998) The colonization of turkey by thermophilic *Campylobacter*s. J Appl Microbiol. 85: 224-230.



Identification of *Campylobacter* spp. from poultry skin using methods based on bacterial culture and polymerase chain reactions

Ebrahimi Lagha, F.^{1*}, Zeynali,, F.², Rezazadeh Bari, M.²

¹Graduated from the Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

²Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture University of Urmia, Urmia, Iran

(Received 31 August 2016, Accepted 21 November 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Food infections caused by *Campylobacter* are one of the gastrointestinal inflammations in humans is health and economic losses in the community is important. **OBJECTIVES:** To determine the prevalence of *Campylobacter* contamination in chicken skin samples of Urmia, using bacterial culture and polymerase chain reactions. **METHODS:** 80 samples of chicken skin from the Protein Gostare Sina slaughter house located in the city of Urmia in equal numbers in the winter and spring seasons were collected. The survival of *Campylobacter* after 24 hours in refrigerated conditions was studied in samples. Positive samples were used for DNA extraction and PCR. To investigate the phylogenetic isolates, positive samples PCR were sequenced. **RESULTS:** 58/75% of chicken skin using bacterial cultures, *Campylobacter* were positive. The Results study the survival *Campylobacter* in cold conditions after 24 hours, showed that no significant decrease in the survival *Campylobacter* as well as contamination levels were significantly higher in spring than in winter, which may be due to the high temperature of environment that created the favorable conditions for *Campylobacter*. **CONCLUSIONS:** Chicken skin is the reservoir of *Campylobacter*. This issue of public health care and control at all stages of production and supply of poultry products, also the transfer of it to other parts of poultry carcasses should be considered.

Keyword: chicken skin, *Campylobacter*, bacterial cultures, polymerase chain reaction

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. 400 BP bands of gene amplification 16SRRNA, NC: negative control, L: BP50,1-6 isolates the skin mark.

Table. The results of 16S RRNA sequencing isolates of chicken skin.

*Corresponding author's email: fateme.lagha@yahoo.com, Tel: 026-44223981, Fax: 026-44223981

J. Vet. Res. 71, 4, 2016

