مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۴، ۴۳۶-۴۳۱
Journal of Veterinary Research. 71,4:431-436, 2016
Original Article

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

فاطمه ابراهیمی لقا[1*] فریبا زینالی[2] محمود رضازاد باری[2]
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 زیان‌های 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 پلیمراز 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. **نتیجه گیری 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 پلیمراز

مقدمه

بیماری‌های منتقله از مواد غذایی از علل اصلی گاستروآنتریت 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 هیواینتستینالیس 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. کمپیلوباکتریوزیس در انسان بوسیله گونه‌های گرما دوست ایجاد می‌شود بطوریکه اخیرا 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) بطوری‌که 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 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 (۵۰۰cfu/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 ۱۶S 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

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۶-۴۴۲۲۳۹۸۱ نمابر: ۰۲۶-۴۴۲۲۳۹۸۱ Email: fateme.lagha@yahoo.com

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 پپتونه 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 پرگنه 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 بیوشیمیائی از قبیل اکسیداز و کاتالاز نیز انجام شد. مثبت بودن آزمون‌های فوق بر روی پرگنه‌های مورد آزمایش به منزله محتمل بودن حضور کمپیلوباکتر بود. در ادامه به منظور خالص سازی، پرگنه‌ها چندین بار بر روی محیط کشت کمپیلوباکتر سلکتیو آگار کشت خطی داده شدند. پتری دیش‌ها در داخل جار بیهوازی با گازپک 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 ۱ml از آن در داخل میکروتیوپ ml ۱/۵ ریخته شده و به مدت ۱min با دور ×g۱۲۰۰۰، در دمای ۲۵°C سانتریفوژ (اپندروف آلمان) شد. پس از دور ریختن مایع فوقانی، ۰/۵ml از سوسپانسیون میکروبی اولیه و ۰/۵ ml از محیط کشت مایع استریل حاوی ۳۰٪ گلیسرول (مرک آلمان)، به میکروتیوپ افزوده و پس از اختلاط درون میکروتیوپ، در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد.

تهیه DNA جهت PCR: DNA از پرگنه‌هایی که بعنوان کمپیلوباکتر شناسایی شدند به روش جوشاندن استخراج گردید. بدین منظور، پس از فعالسازی جدایه‌ها، پرگنه‌های تک در ml ۴ محیط کشت نوترینت براث (Quelab کانادا) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲°C گرمخانه‌گذاری شدند. سپس مایع تلقیح به ۲ تیوپ ۲ml تقسیم و در ×g ۱۰۰۰۰ به مدت ۳min سانتریفوژ شد. پس از حذف مایع فوقانی تیوپ‌ها، به یکی از آن‌ها ۱۰۰µl آب مقطر استریل اضافه و پس از ورتکس، محتویات آن به تیوپ 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 ۵min در ×g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی که حاوی DNA بود در آزمایشات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

شناسایی مولکولی کمپیلوباکتر با بکار گیری واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): جفت پرایمر عمومی ژن ۱۶S rRNA (Forward-E: AACTGGAGGAAGGTGGGGA، Reverse-E: AGGAGGTGATCCAACCGCA) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵µl بصورت زیر تهیه شد: PCR Master mix (فرمنتاس آلمان) به میزان ۱۲/۵µl، از هر پرایمر (سیناژن ایران) به میزان ۱µl، DNA الگو به میزان ۳/۵µl 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 ۴۰s، 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 مدت۵min صورت پذیرفت.

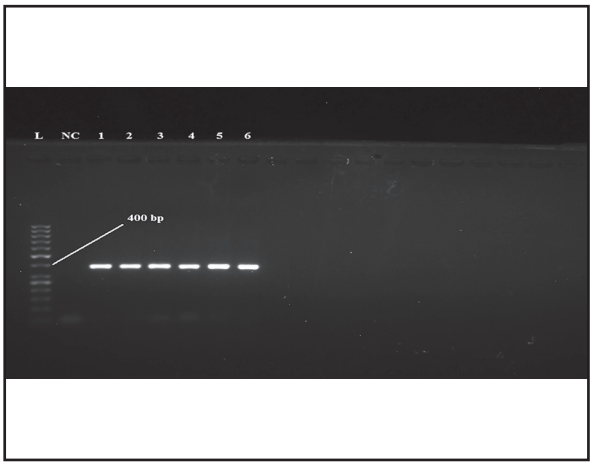
الکتروفورز محصولات PCR: پس از انجام واکنش PCR، برای هر واکنش ۳ µl از محصول واکنش به همراه ۱µl رنگ بارگذاری (فرمنتاس آلمان) و ۲ µl آب مقطر دو بار تقطیر در هر چاهک الکتروفورز بارگذاری شد. در یکی از چاهک‌ها ۱/۵ µl نشانگر یک کیلو جفت باز (فرمنتاس آلمان) و در چاهکی دیگر نیز نمونه‌ی کنترل منفی که فاقد DNA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

تعیین توالی جدایه‌ها: پس از ارزیابی صحت انجام واکنش PCR توسط الکتروفورز و مشاهده‌ی باند در موقعیت ۴۰۰bp، 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 مانی 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



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

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

Isolate Code	Name of Bacteria	ID in% NCBI	Accession Number
a۱	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	۹۸	AF۵۵۰۶۲۹/۱
a۲	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	۱۰۰	AF۵۵۰۶۲۹/۱
a۳	*Campylobacter lari* RM۲۱۰۰ ۱۰۶۰D-ATCC BAA strain RM۲۱۰۰	۱۰۰	NR۰۷۴۵۵۵/۱
a۴	*Campylobacter jejuni* subsp. jejuni	۹۹	AF۵۵۰۶۲۹/۱
a۵	*Campylobacter coli* strain X۳	۹۸	GQ۱۶۷۶۷۲۱
a۶	*Campylobacter jejuni* subsp. ATCC۷۰۰۸۱۹ ۱۱۱۶۸ jejuni NCTC ۱۱۱۶۸ strain NCTC	۹۹	NR۰۷۴۵۵۰/۱

دمای یخچالی با میانگین بار میکروبی ۳/۴±۰/۶۱۹ cfu/g، نشان داد تعداد باکتری‌ها کاهش قابل توجهی نداشته و کاهش قدرت زنده مانی معنی‌دار نبود. نتایج حاصل از توالی‌یابی، ۶۶/۶ ٪ کمپیلوباکتر ژژونی، 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 ژژونی است که همواره بعنوان شایع‌ترین گونه بازیافت شده از گوشت و محصولات مرغ گزارش شده است (۲۷،۲۹) .میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژژونی تا ۱۰۰ ٪ در مرغ و بوقلمون تازه ذبح شده نیز گزارش شده است (۳،۲۶).

بحث

تعداد۸۰ 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 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 ژژونی، 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 (۱۳،۲۳). لذا یک مرحله غنی‌سازی برای تشخیص تعداد کمی از باکتری‌ها و سلول‌های آسیب دیده نیاز است.

پوست مرغ از منابع اصلی کمپیلوباکتر ژژونی در نظر گرفته شده است (۲۳) بطوری‌که 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 ژژونی 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 ۳/۶۸±۰/۱۸۷ cfu/g و cfu/g ۵/۵۲±۰/۲۸۳ 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 بیاید 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. درحالی‌که 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 ژژونی و کلی بوده که مرتبط با بیشترین موارد کمپیلوباکتریوزیس در انسان است (۸) که مشابه با نتایج این مطالعه بود.

PCR: ابتدا DNA جدایه‌های مورد نظر با روش جوشاندن استخراج

شـد. در مرحلـه بعـد بـا کمـک پرایمرهـای عمومـی Forward-E و Reverse-Eتکثیر ژن ۱۶SrRNA، با اسـتفاده از دستگاه مستر سایکلیر گرادیانـت (اپندروف آلمان) انجام پذیرفت. تصویـر۱، پروفایل‌های باندی مربوط به سویه‌های مختلف مورد آزمون را نشان می‌دهد. طول قطعه مورد نظر ۴۰۰bp می‌باشـد. همان‌گونه که در شـکل مشخص می‌باشد، مکان قرارگیری باندها، با توجه به نردبان مورد اسـتفاده، که از نوع Generler ۵۰ bp بود و طول قطعات را تا ۱۰۰۰bp نشـان می‌داد، دقیقا 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 شـرکت کننده در واکنش PCR بجز DNA مربوط به رشته الگو می‌باشد، آمپلیکون مربوط به نمونه کنترل منفی باید در هنگام الکتروفـورز و مشـاهده در زیر نور UV، فاقد الگوی باندی باشـد. هرچند سیکل‌های دمایی برای میکروتیوب مربوط به نمونه کنترل منفی طی شده است، اما به دلیل نبودن رشته الگو، رشته‌ای جدید ایجاد نشده است.

سکانسـینگ: پس از اتمام عملیات PCR، محصولات واکنش جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. نتایج حاصل از توالی‌یابی در جدول۱ ارائه شـده اسـت. نمونه‌های a۱ تا a۶ جدایه‌های پوسـت مرغ می‌باشد.

نتیجه گیری نهایی: نتایج نشـان داد که پوسـت 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 مسـئولین محترم پژوهشـکده زیسـت و فناوری و آزمایشـگاه میکروبیولوژی گروه صنایع غذایی دانشگاه ارومیه که این پژوهش در آنجا اجرا گردیده کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

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. 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., Hadziosmanoviv, M., Zdolec, N. (2006) Micobiological 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 evalua-tion 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., Fedroka-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., Hiett, 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 Campylobacters. 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]

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

[2]*Department 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**