نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره ۴/ سال ۱۳۹۴

جداسازی *کمپیلوباکتر* از سنگدان‌های مرغ در ارومیه با استفاده از روش PCR

فاطمه ابراهیمی لقا[۱]، فریبا زینالی[*۲]، محمود رضازاد باری[۲] و جواد علی اکبرلو[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹٤/۵/٤

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
[۲] بترتیب استادیار و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
[۳] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
[*] مسئول مکاتبه: Email: f_zeynali@yahoo.com

چکیده

گونه‌های *کمپیلوباکتر* به خصوص *کمپیلوباکتر ژژونی* از شایع‌ترین عوامل گاستروآنتریت باکتریایی در سراسر دنیا هستند که اغلب از طریق مصرف گوشت و فرآورده‌های طیور از جمله سنگدان مرغ منتقل می‌شوند. این مطالعه با هدف تعیین شیوع گونه‌های *کمپیلوباکتر* در سنگدان مرغ انجام شد. از دی ماه ۱۳۹۲ تا خرداد ماه ۱۳۹۳، ۸۰ نمونه سنگدان مرغ از کشتارگاه پروتئین گستر سینا واقع در شهرستان ارومیه جمع‌آوری و پس از کشت، ایزوله‌های گرم منفی و کاتالاز مثبت آن‌ها انتخاب شدند، و ژن ناحیه 16S rRNA ایزوله‌ها به کمک پرایمرهای عمومی با تکنیک PCR تکثیر داده شد. نتایج نشان داد که ٦۲/۵ درصد از نمونه‌های سنگدان با استفاده از تست‌های فنوتیپی *کمپیلوباکتر* مثبت بودند. تنوع باکتری‌های *کمپیلوباکتر* در نتیجه تعیین توالی به صورت ٤۰ درصد *کمپیلوباکتر ژژونی*، ۲۰ درصد *کمپیلوباکتر کلی* و ٤۰ درصد *کمپیلوباکتر لاری* تشخیص داده شد. 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. لذا رعایت اصول بهداشتی و نظارت دقیق در خط کشتار و پروسه بسته بندی برای کنترل نقاط بحرانی و به حداقل رساندن انتقال باکتری‌های پاتوژن منتقله از غذا از جمله *کمپیلوباکتر* به فرآورده‌های گوشت و مرغ مفید است.

واژگان کلیدی: سنگدان مرغ، *کمپیلوباکتر*، PCR

مقدمه

جنس *کمپیلوباکتر* متعلق به خانواده *کمپیلوباکتریاسه*، راسته *کمپیلوباکتریاس*، طبقه *اپسیلون پروتئوباکتریا* از شاخه *پروتئوباکتریا* است که در سال ۱۹٦۳، شناسایی شد (فاستر و همکاران ۲۰۰٤). بیش از ۲۰ گونه *کمپیلوباکتر* وجود دارد (من ۲۰۱۱) که مهم‌ترین آن‌ها از نظر غذایی *کمپیلوباکتر ژژونی* زیرگونه *ژژونی* می‌باشد که عامل بیش از ۸۵ درصد از عفونت‌های روده‌ای *کمپیلوباکتریایی* می‌باشد (دشپاند ۲۰۰۲). گونه‌های *کمپیلوباکتر* گرم منفی، میکروآئروفیلیک، بدون اسپور، خمیده، با ظاهر میله‌ای شکل بوده که با دو سلول تشکیل یک زنجیره کوتاه شبیه بال مرغ دریایی می‌دهد (هانت

Archive of SID
www.SID.ir

۱۹۹۲، عامری و رحیمی ۲۰۱۱). اکثر اعضای جنس *کمپیلوباکتر* بواسطه تاژک قطبی در یک یا دو انتها متحرک هستند (پارکهیل و همکاران ۲۰۰۰). این میکروارگانیسم‌ها از کربوهیدرات‌ها تولید اسید نکرده و از اسیدهای آمینه به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند (هولت و همکاران ۲۰۰۰). گزارش‌های اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که گوشت مرغ هنوز عامل اصلی بیماری-های ناشی از مواد غذایی در انسان است (کوزاسینسیکی و همکاران ۲۰۰۶) که می‌تواند به علت وجود ترکیبات مغذی، مقادیر مطلوب pH و فعالیت آبی، محیطی ایده‌آل برای تعدادی از پاتوژن‌های منتقله از مواد غذایی از جمله *کمپیلوباکتر ژژونی* باشد (الدوقیم و الطبری ۲۰۱۰، جیمز و همکاران ۲۰۰۶). فرآورده‌های جانبی طیور از جمله سنگدان از نظر اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و مواد معدنی غنی بوده و بطور وسیعی دراجتماع به علت قیمت پایین، ارزش تغذیه‌ای بالا و طعم متفاوت و مطلوب طرفداران زیادی دارد (سوزوکی و یاماموتو ۲۰۰۹) به همین دلیل کنترل ایمنی این محصولات از عرضه تا مصرف دارای اهمیت می‌باشد. روش‌های معمول شناسایی *کمپیلوباکتر* به علت سرعت رشد آهسته و روش‌های غنی‌سازی، زمان‌بر است (انگبرگ و همکاران ۲۰۰۹) در حالی‌که روش‌های مولکولی بر پایه واکنش های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، جایگزین قابل اعتمادی برای روش‌های فنوتیپی در شناسایی میکروارگانسیم-های هدف از نمونه‌های غذایی است (دنیس و همکاران ۲۰۰۱). ژن 16S rRNA به طور گسترده برای تشخیص و شناسایی سریع گونه‌های *کمپیلوباکتر* استفاده شده است (ماهر و همکاران ۲۰۰۳، لینتون و همکاران ۱۹۹۷، کولکارنی و همکاران ۲۰۰۲). همچنین PCR به دلیل سرعت، حساسیت و قدرت تکثیر بالا بطور گسترده‌ای در تشخیص *کمپیلوباکتر* بکار می‌رود (بنگ و همکاران ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲، راسموسن و همکاران ۱۹۹۶) که علاوه بر سلول‌های زنده، قادر به تشخیص سلول‌های غیر قابل کشت باکتری از مواد مختلف می‌باشد (پانیکر و بژ ۲۰۰۳). هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های *کمپیلوباکتر* از نمونه‌های سنگدان 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 16S rRNA می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

محیط‌های کشت *کمپیلوباکتر* سلکتیو آگار، آب پپتونه بافری، *کمپیلوباکتر* سلکتیو براث، نوترینت براث، مکمل آنتی بیوتیکی *کمپیلوباکتر* از شرکت Quelab ساخت کشور کانادا، گازپک نوع C، گلیسرول از شرکت مرک ساخت کشور آلمان، مستر میکس PCR، آب فاقد نوکلئاز، رنگ بارگذاری و نشانگر یک کیلو جفت باز از شرکت فرمنتاس ساخت کشور آلمان، پرایمرهای فوروارد و ریورس از شرکت سیناژن ساخت کشور ایران، آگارز از شرکت اینوتروژن ساخت کشور آمریکا بود.

تجهیزات

جار بیهوازی از شرکت مرک آلمان، اتوکلاو از شرکت ولکو آلمان، گرمخانه از شرکت ممرت آلمان، سانتریفوژ، ترمومیکسر، ترموسایکلر همگی از شرکت اپندروف ساخت آلمان، ژل داکیومنت از شرکت Gel Logic ساخت آمریکا بود.

نمونه برداری

از دی ماه ۱۳۹۲ تا خرداد ماه ۱۳۹۳، ۸۰ نمونه سنگدان مرغ بعد از مرحله شستشو بطور تصادفی از کشتارگاه پروتئین گستر سینا واقع در ارومیه، نمونه‌برداری شدند (۴۰ نمونه در فصل زمستان و ۴۰ نمونه در فصل بهار). نمونه‌های جمع آوری شده با استفاده از ظروف سترون بطور جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی استریل و به منظور جلوگیری از آلودگی ثانویه در داخل کیسه دارای یخ قرار داده شده و بلافاصله به آزمایشگاه

Archive of SID

www.SID.ir

میکروبیولوژی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه ارومیه منتقل شدند.

شناسایی، شمارش و جداسازی *کمپیلوباکتر*

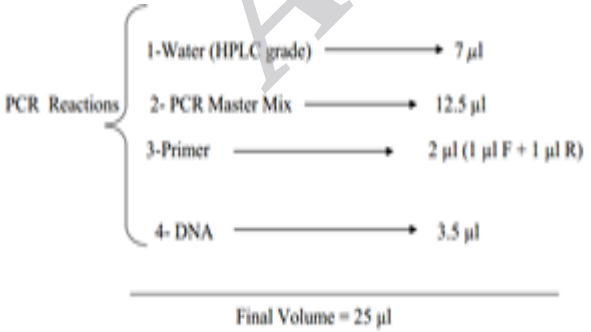
به منظور غنی‌سازی، ابتدا یک گرم از هر نمونه توزین و پس از قرار دادن در داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۹ سی‌سی آب پپتونه بافری استریل (رقت ۰/۱) و ورتکس مناسب، در دمای ۴۲ C° به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه-گذاری شد. پس از سپری شدن این مدت، رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-7} تهیه شده و ۰/۱ میلی‌لیتر آن بر روی محیط کشت *کمپیلوباکتر* سلکتیو آگار حاوی مکمل آنتی بیوتیکی *کمپیلوباکتر* کشت سطحی داده شد. بعد از زمان مناسب گرمخانه‌گذاری (۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت)، پلیت‌هایی که در آن کلنی باکتری رشد کردند، پس از شمارش، جداسازی و از نظر رنگ‌آمیزی گرم و تست حرکت بررسی شدند، در صورت مشاهده باکتری باسیل خمیده، گرم منفی و متحرک، آزمون‌های بیوشیمیائی از قبیل کاتالاز و اکسیداز (بولتون و همکاران ۱۹۹۲) نیز انجام شد. مثبت بودن آزمون‌های فوق بر روی کلنی‌های مورد آزمایش به منزله‌ی محتمل بودن حضور *کمپیلوباکتر* بود. در ادامه به منظور خالص سازی، کلنی‌ها چندین بار برروی محیط کشت *کمپیلوباکتر* سلکتیو آگار به صورت ایزوله کشت داده شدند. پلیت‌ها در داخل جار بیهوازی با گازپک نوع C به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد گرمخانه-گذاری و به منظور تأیید خلوص رنگ‌آمیزی گرم شد (اسکیرو و همکاران ۱۹۸۰). سپس جهت تأیید قطعی، از تکنیک PCR برای تکثیر قطعه‌ی به اندازه ۳۷۰ جفت باز از ژن 16S rRNA استفاده گردید (حسین زاده و همکاران ۲۰۱۴). برای تهیه ذخیره باکتریایی، از کشت-های 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. پس از آن یک میلی‌لیتر از آن در داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰×g، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن مایع فوقانی، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی اولیه و ۰/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع استریل حاوی ۳۰٪ گلیسرول، به میکروتیوپ افزوده و پس از اختلاط درون میکروتیوپ، در فریزر ۸۰ C°- نگهداری شد (عدالتیان ۱۳۹۰).

استخراج DNA جدایه‌ها

جهت استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده شد. پس از فعالسازی جدایه‌ها، کلنی‌های تک در ۴ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ C° گرمخانه‌گذاری شدند. سپس مایع تلقیح به ۲ تیوپ ۲ میلی‌لیتری تقسیم و در ۱۰۰۰۰ ×g به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از حذف مایع فوقانی تیوپ‌ها، به یکی از آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و پس از ورتکس، محتویات آن به تیوپ دوم انتقال داده شد. محتویات تیوب دوم پس از ورتکس، به ترمومیکسر، در دمای ۹۹ درجه سانتیگراد به مدت ٦ دقیقه منتقل، و در انتها به مدت ٥ دقیقه در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. بدین صورت سلول متلاشی شده و DNA سلول به تیوپ تمیز انتقال داده شد (لیو ۲۰۰۸).

انجام واکنش PCR

هر مخلوط واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر حجم دارد که اجزای آن در شکل یک آمده است.



شکل ۱- مشخصات اجزای مخلوط واکنش PCR

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
Forward-E	AGGAGGTGATCCAACCGCA
Reverse -E	AACTGGAGGAAGGTGGGGA

پس از تهیه مخلوط‌های واکنش، میکروتیوب‌ها را در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده و برنامه ذیل بر اساس مطالعات انجام شده توسط قانع و همکاران (۱۳۸۹) به دستگاه داده شد:

مرحله اول: دمای ۹۵ °C به مدت ٤ دقیقه، یک سیکل؛

مرحله دوم: دمای ۹۵ °C به مدت ٤٠ ثانیه، دمای ٥٦ °C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ °C به مدت ٤٠ ثانیه ، ۳۵ سیکل؛

مرحله سوم: دمای ۷۲ °C به مدت ٥ دقیقه، یک سیکل؛

مرحله چهارم: دمای ٤ °C بصورت نامحدود.

الکتروفورز محصول PCR

پس از انجام واکنش PCR، برای هر واکنش ۳ میکرولیتر از محصول واکنش به همراه یک میکرولیتر رنگ بارگذاری و ۲ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر در هر چاهک الکتروفورز بارگذاری شد. در یکی از چاهک‌ها ۱/٥ میکرولیتر نشانگر یک کیلو جفت باز و در چاهکی دیگر نیز نمونه‌ی کنترل منفی که فاقد DNA جدایه‌ها بود بارگذاری شدند. الکتروفورز مخلوط‌های بارگذاری شده در ژل آگارز ۱/٥ درصد حاوی اتیدیوم برماید و در بافر TBE 1X با جریان ۷٥ ولت، به مدت ۲ ساعت انجام پذیرفت. پس از اتمام الکتروفورز از ژل مورد نظر توسط دستگاه ژل داکیومنت تحت اشعه‌ی ماورا بنفش عکس-برداری صورت گرفت (قانع و همکاران ۱۳۸۹).

تعیین توالی جدایه‌ها

پس از ارزیابی صحت انجام واکنش PCR توسط الکتروفورز و مشاهده‌ی باند در موقعیت ۳۷۰ جفت بازی، محصولات واکنش PCR، ٥ ایزوله سنگدان 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)، مقایسه شده و مشابه‌ترین سویه به ایزوله‌ی مورد نظر تعیین گردید. تشابه بالای ۹۷ درصد به عنوان تشابه معنی‌داری تلقی شد.

تحلیل آماری

برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار MSTATC با مقایسه‌ی میانگین‌ها در سطح ٥٪ برای بررسی معنی‌داری میزان آلودگی نمونه‌ها استفاده شد. تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

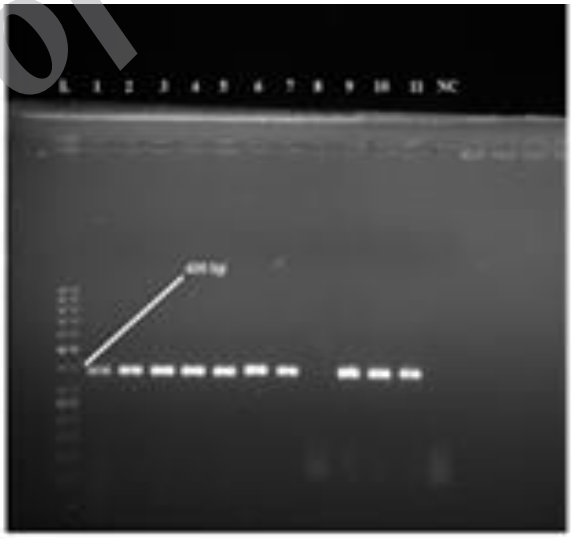
نتایج و بحث

طبق نتایج حاصل از آزمایشات ٦۲/٥ درصد از نمونه-های سنگدان با استفاده از روش‌های فنوتیپی *کمپیلوباکتر* مثبت بودند. شیوع *کمپیلوباکتر* در نمونه‌ها بالا بود که این نتیجه مشابه با نتایج گزارش شده توسط دنیس و همکاران (۲۰۰۱) می‌باشد که تعداد مشابهی (۷۰ نمونه) از نمونه‌های مرغ از سوپر مارکت‌های فرانسه را بررسی کرده بودند. احتمالا دلیل این شیوع بالا آن است که چون لاشه مرغ در موقعیت حلقه آویز در طول کشتار و فرآیندهای بعدی قرار دارد، *کمپیلوباکتر* می‌تواند از روده از طریق آلودگی مدفوعی بر روی سطح لاشه منتقل شود. علاوه براین، آب شستشو در طول فرآیند زهکشی باعث آلودگی در طول لاشه می‌شود (اوگارت-رویز و همکاران ۲۰۱۲). در مطالعه مشابهی از رحیمی در طی سالهای ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ در خصوص شیوع گونه-های *کمپیلوباکتر* در سنگدان مرغ‌های تهیه شده از دو کشتارگاه صنعتی شهرستان شهرکرد میزان آلودگی ۹۱ نمونه از ۱۲۰ نمونه مورد بررسی ۷٥/۸ درصد گزارش شده است (رحیمی ۱۳۹۲). سلام و همکاران (۲۰۰۷) در ژاپن میزان آلودگی سنگدان مرغ به *کمپیلوباکتر* را ٤٥ درصد گزارش کرده‌اند. یاماموتو و سوزوکی (۲۰۰۹) از ژاپن میزان آلودگی سنگدان مرغ را ٦۲/۲ درصد گزارش نموده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر مشابه می‌باشد. اختلافات موجود بین نتایج گزارش شده از مناطق مختلف را می‌توان به میزان ابتلا طیور در مناطق مختلف،

Archive of SID

www.SID.ir

فاصله زمانی بین مطالعات، اختلاف در نحوه کشتار و رعایت اصول بهداشت در طول مراحل مختلف کشتار، فصول نمونه گیری و حساسیت روش‌های آزمایش نسبت داد (رحیمی ۱۳۹۲). داده‌های حاصل از شمارش باکتری توسط نرم افزار MSTATC و آزمون Student's-t نشان داد که میانگین بار میکروبی در فصل زمستان ۰/۲۱۷±٤/٤۲ cfu/g، و در فصل بهار در نمونه-های سنگدان مرغ ۰/۳٤±٦/۰٥ cfu/g بود، پس مشخص است که میزان آلودگی در فصل بهار بطور معنی‌داری بیشتر از فصل زمستان می‌باشد. بالا بودن میزان آلودگی در فصل بهار ممکن است به دلیل بالا بودن درجه حرارت محیط و ایجاد شرایط مناسب برای رشد *کمپیلوباکتر* باشد.



شکل ۲- باندهای ۳۷۰bp حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA، NC: کنترل منفی، L: نشانگر bp ۵۰، ۱-۱۱ جدایه‌های سنگدان مرغ

شکل ۲، پروفایل‌های باندی مربوط به سویه‌های مختلف مورد آزمون را نشان می‌دهد. طول قطعه‌ی مورد نظر ۳۷۰ جفت بازی می‌باشد. همان‌گونه که در شکل مشخص می‌باشد، مکان قرارگیری باندها، باتوجه به نردبان مورد استفاده، که از نوع Generler 50 bp بود و طول قطعات را تا ۱۰۰۰ جفت باز نشان می‌داد، دقیقا همان طول قطعه را نشان می‌دهد، که بیانگر صحیح بودن مراحل انجام آزمون می‌باشد.

میزان بالای آلودگی گونه‌های *کمپیلوباکتر* در طی کشتار طیور در کشتارگاه و همچنین در ماشین آلات فرآیند قبلا مشاهده شده است (آلتر و همکاران ۲۰۰٥، استرن و همکاران ۲۰۰۱، والاس و همکاران ۱۹۹۸). گزارش‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های *کمپیلوباکتر* در تمام مراحل فرآیند کشتار طیور حضور دارند (اونو و یاماموتو ۱۹۹۹، آلتر و همکاران ۲۰۰٥، سان و همکاران ۲۰۰۷)، اگرچه برخی از عوامل از جمله فصل نمونه برداری، موقعیت جغرافیایی، شرایط مختلف کارخانه و نوع روش فرآوری ممکن است در آلودگی توسط *کمپیلوباکتر* در طول فرآیند طیور تأثیر بگذارد (لوگوه و همکاران ۲۰۰۳).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که ٦۲/٥ درصد از نمونه‌های سنگدان مرغ با استفاده از روش‌های فنوتیپی *کمپیلوباکتر* مثبت بودند. تنوع باکتری‌های *کمپیلوباکتر* به صورت ٤۰ درصد *کمپیلوباکتر ژژونی*، ۲۰ *درصد کمپیلوباکتر کلی* و ٤۰ درصد *کمپیلوباکتر لاری* در سنگدان مرغ تشخیص داده شد. 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 رشد *کمپیلوباکتر* باشد. همانطور که مشاهده شد حضور باکتری‌های مولد بیماری‌های معدی- روده‌ای در گوشت به خصوص گوشت طیور شایع است که می‌تواند سلامت مصرف کننده را به شدت تحت تأثیر قرار دهد. لذا رعایت اصول بهداشتی و نظارت دقیق در خط کشتار و پروسه بسته بندی برای کنترل نقاط بحرانی و به حداقل رساندن انتقال باکتری‌های پاتوژن منتقله از غذا از جمله *کمپیلوباکتر* به فرآورده‌های گوشت و مرغ مفید است. همچنین بهتر است از مصرف فرآورده‌های طیور خام و نیم پخته پرهیز کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

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.

منابع مورد استفاده

رحیمی ا، ۱۳۹۲، بررسی آلودگی گوشت و فرآورده‌های جانبی مرغ به گونه‌های *کمپیلوباکتر* در شهرکرد، مجله دامپزشکی ایران، دوره نهم، شماره ۱، ۳۶- ۳۰.

عدالتیان م ر، ۱۳۹۰، شناسایی و تعیین هویت فلور لاکتیکی پنیرهای حاصل از شیر خام با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت و روش‌های مولکولی، رساله دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد، ۷۶- ۷۵.

قانع م، بهادر ن، اقبالی م، و باصری صالحی م، ۱۳۸۹، شناسایی فنوتایپی و مولکولی *Campylobacter* و *Arcobacter* جدا شده از نمونه‌های محیطی در شمال ایران، مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، سال چهارم. ۶۸- ۵۷.

Al- Dughaym A, Al- Tabari G, 2010. Safety and quality of some chicken meat products in Al-Ahsa markets-Saudi Arabia. Journal of Biological Science 17: 37– 42.

Alter T, Gaull F, Froeb A and Fehlhaber K, 2005. Distribution of *Campylobacter Jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. Food Microbiology 22, 345–351.

Bang DD, Pedersen K, and Madsen M, 2001. Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 9(2): 97- 113.

Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K, and Madsen M, 2002. Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (hipO) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. Molecular and Cellular Probes 16(5): 359- 369.

Bolton FJ, Wareing DRA, Skirrow MB, Hutchinson DN, 1992. Identification and biotyping of *campylobacters*. In: Jones, D., Skinner, F.A Eds.), Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology) Society for Applied Microbiology Technical Series No.29 Blackwell Scientific Publications, Oxford pp 151–161.

Corry JE and Ataby HI, 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Journal of Applied Microbiology 90: 96– 114.

Deshpande SS, 2002. Handbook of Food Toxicology. New York, Mercel Dekker 496- 502.

Denis MJ, Refrégier-Petton M, Laisney J, Ermel G, Salvat G, 2001. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers, use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Applied Microbiology 91: 255–267.

Engberg j, On SLW, Harrington CS, Gerner- Smidt P, 2000. Prevalence of *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter, and Sutterella* spp. In human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *campylobacters*. Journal of Clinical Microbiology 38: 286– 291.

Fooster G, Holmes B, Steigerwalt AG, Lawson PA, Thorne P, Byrer DE, Ross HM, Xerry J, Thompson PM and Collins MD, 2004. *Campylobacter* insulaenigrae sp. Nov., isolated from marine mammals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54(6): 2369- 2373.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST, 2000. Aerobic/ Microaerophilic, Motile, Helical/Vibrioid Gram- negative Bacteria. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th thed.

Hosseinzadeh S, Mardani K, Aliakbarlu J and Ghorbanzadehghan M, 2014. Occurrence of *Campylobacter* in chicken wings marketed in the northwest of Iran. International Food Research Journal. Accepted.

Hunt MJ, 1992. Isolation of thermophilic *Campylobacter* species from foods and *water*. FDA Bacteriological Analytical Manual. 7th thed. AOAC International, Arlington VA USA.

Archive of SID

www.SID.ir

James C, Vincent C, Lima TI, James SJ, 2006. The primary chilling of poultry carcasses areview. International Journal of Food Refrigeration 29: 847– 62.

Kulkarni SP, Lever S, Logan JM, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS, 2002. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. Journal of Clinical Pathology 55: 749- 753.

Kozacinski L, Hadziosmanoviv M, Zdolec N, 2006. Micobiological quality of poultry meat on the Croatian market, Vetrinarski Arhiv. Journal Faculty of Veterinary Medicine 76: 305– 13.

Lee CY, Panicker G and Bej AK, 2003. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by Cova Link NH micro well plate sandwich hybridization. Journal of Microbiology Methods 53: 199– 209.

Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J, 1997. PCR detection, identification to species level, and finger printing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. Journal of Clinical Microbiology 35: 2568- 2572.

Liu D, 2008. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. International Journal of Food Microbiology 122: 229 – 242.

Logve CM, Sherwood JS, Elijah LM, Olah PA and Dockter MR, 2003. The incidence of *Campylobacter* spp. On processed turkey from processing plants in the mid western United States. Journal Applied Microbiology 95: 234– 241.

Maher M, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carroll C, Cormican M, 2003. Evaluation of culture methods and a DNA probe- based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. Journal of Clinical Microbiology 41: 2980– 2986.

Man SM, 2011.The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat. Rev*. Gastroenterol. Hepatol 8: 669– 685.

Ono K, and Yamamoto K, 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama- Japan. International Journal of Food Microbiology 47: 211– 219.

Parkhill J, Wren BW, Mun gall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al., 2000. The genome sequence of the food- borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hyper variable sequences. Nature 03: 665- 668.

Rahimi E, and Ameri M, 2011. Anti microbial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from raw chicken, turkey, quail, partridge, and ostrich meat in Iran. Food Control 22: 1165- 1170.

Rasmussen HN, Olsen JE, Jorgensen K, and Rasmussen OF, 1996. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken faecal samples by PCR. Letters in Applied Microbiology 23(5): 363- 366.

Sallam KI, 2007. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by- products retailed in Sapporo ares, Hokkaido, Japan. Food Control 18: 1113- 20.

Skirrow MB, Benjamin J, 1980. '1001' campylobacters: culturfatty al characteristics of intestinal *campylobacters* from man and animals. Journal of Hygiene 85, 427–442.

Son I, Engien MD, Berrabg ME, Fedroka- Cary PJ and Harrison MA, 2007. Prevalence of *Acrobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. International Journal of Food Microbiology 113: 16– 22.

Stern NJ, Fedorka- Cray P, Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Hiett KL, et al. 2001. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected US poultry production and processing operation. Journal Applied Microbiology 64: 1705– 1710.

Suzuki H, and Yamamoto S, 2009. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: A literature survey. Journal of Veterinary Medical Science 71 (3): 255- 261.

Ugarte- Ruiz M, Gómez- Barrero S, Porrero MC, Álvarez J, García M, Comerón MC, et al. 2012. Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. Journal of Applied Microbiology 113(1): 200- 208.

Wallace JS, Stanley KN, and Jones K, 1998. The colonization of turkey by thermophilic *Campylobacters*. Journal of Applied Microbiology 85: 224– 230.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation of *campylobacter* from poultry gizzards in urmia using PCR

F Ebrahimi lagha[1], F Zeynali[2], M Rezazadeh bari[3] and J Aliakbarlou [4]

Received: February 01, 2015 Accepted: July 26, 2015

[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[2]Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture University of Urmia, Urmia, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
*Corresponding author E mail: f_zeynali@yahoo.com

Abstract

Campylobacter species, especially *Campylobacter jejuni* is the most common cause of bacterial gastroenteritis around the world, often through the consumption of meat and poultry products, including chicken gizzard, are transmitted. In winter 1392 to spring 1393, This study has been aimed to determine the prevalence of *Campylobacter* species in poultry gizzard in Urmia, 80 samples of gizzard from the Protein Gostar Sina slaughterhouse located in the city of Urmia collected after culture, gram- negative and catalase- positive isolates selected, of the 16S rRNA gene was random and their General primers were amplified by PCR technique. The results showed that 62/5% of gizzards using selective culture of *Campylobacter* positive were detected. Diversity of *Campylobacter* isolates to the case: 40 percent *Campylobacter jejuni*, 20 percent *Campylobacter coli* and 40 percent *Campylobacter lari* detection in chicken gizzard was given. Contamination levels were also significantly higher in spring than in winter, which may be due to the high temperature of environment that was created the right conditions for *Campylobacter*. Therefore, sanitation and accurate monitoring of the destruction and packaging process for control of critical points and minimize the transmission of pathogenic bacteria such as *Campylobacter* Foodborne to meatand poultry products useful.

Key words: *Campylobacter*, chicken gizzard, PCR

Archive of SID

www.SID.ir