JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره اول، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۴: ۱۹-۱۱

بررسی آلودگی گله‌های طیور گوشتی در آخر دوره پرورش به کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای

عنایت بریزی [۱]، سید شهرام شکرفروش [۲*]، سعید حسین‌زاده [۳]، مصطفی عبدالهی [۱]

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

۳- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۰

چکیده

کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای به عنوان عامل اصلی آنتریت باکتریایی انسان در تمام دنیا شناخته شده‌اند. معمولاً پرندگان نقش معنی‌داری را در عفونت کمپیلوباکتریایی انسان بازی می‌کنند. شیوع بالای کمپیلوباکتر در گله‌های طیور در مرحله پرورش، سبب ایجاد آلودگی متقاطع در طی کشتار و فرآوری گوشت می‌گردد. در این بررسی میزان آلودگی طیور گوشتی شهرستان شیراز در پایان دوره پرورش به کمپیلوباکتر با روش کشت مستقیم و غنی‌سازی قبل از کشت صورت گرفت. ۱۰۰ مرغداری شهرستان شیراز انتخاب و با مراجعه به کشتارگاه، از هر مرغداری ۲۱ لاشه انتخاب و سیکوم آن‌ها برداشته شد. محتویات هر ۷ سیکوم با هم مخلوط و پس از آماده‌سازی به دو صورت مستقیم در محیط آگار انتخابی و غنی‌سازی در محیط براث قبل از کشت در محیط آگار کشت شدند. جدایه‌ها با PCR تأیید شدند. در آزمایش کشت مستقیم ۵۳/۷٪ نمونه‌ها (۷۰٪ مرغداری‌ها) و در آزمایش غنی‌سازی در براث و کشت در محیط آگار، ۶۰/۰٪ نمونه‌ها (۷۶٪ مرغداری‌ها) مثبت تشخیص داده شدند. میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژژونی ۳۱/۳٪ تا ۳۵/۰٪ و کمپیلوباکتر کولای ۳۶/۷٪ تا ۴۰/۰٪ بود. میزان جداسازی کمپیلوباکتر به وسیله کشت در محیط انتخابی پس از غنی‌سازی در محیط براث نسبت به کشت مستقیم افزایش ۶/۳٪ را نشان داد که تأثیر آماری معنی‌داری داشت. بررسی حاضر نشان داد که آلودگی گله‌های طیور بسیار زیاد است و به منظور کنترل آلودگی، شناخت ریسک فاکتورهای ایجاد آلودگی وکنترل آن‌ها ضروری می‌باشد و برای کنترل آلودگی انسان، علاوه بر رعایت موارد فوق، رعایت بهداشت در کشتارگاه‌ها مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر کولای، طیور گوشتی، مولتی پلکس PCR

** نویسنده مسئول: سید شهرام شکرفروش*

آدرس: گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۱۳۲۲۸۶۹۵۰

پست الکترونیک: shekar@shirazu.ac.ir

مقدمه

کمپیلوباکتر سال‌ها به‌عنوان یک میکروب بیماری‌زای مهم در دام‌ها شناخته شده و یکی از عوامل مهم نازایی و سقط جنین در گاو، گوسفند و خوک محسوب می‌شود. پس از ابداع روش‌های جدید جدا-سازی باکتری از نمونه مدفوع، به عنوان عامل مهم گاستروآنتریت انسان شناخته شد (۶).

کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای به‌عنوان عامل اصلی آنتریت باکتریایی انسان در تمام دنیا شناخته شده‌اند. باکتری از مدفوع افراد مبتلا به گاستروانتریت، بیش از سالمونلا جدا شده است و به همین علت تصور می‌شود که موارد واقعی گاستروآنتریت کمپیلوباکتریایی بسیار بیشتر از موارد گزارش شده بیماری باشد (۲۴). گونه کمپیلوباکتر ژژونی یکی از علل مهم بیماری‌های با منشأ غذا می-باشد و سبب آنتریت باکتری‌ای حاد در انسان می‌شود (۲۳)، به طوری که علت ۸۰٪ تا ۸۵٪ موارد بیماری می‌باشد (۲۴). کمپیلوباکترهای بیماریزای روده‌ای، منشأ حیوانی دارند. در اغلب موارد منشأ بیماری در انسان، حیواناتی که به مصرف غذایی می‌رسند، می-باشند (۳۰).

کارگران کشتارگاه‌ها و مزارع پرورش طیور و قصاب-ها در معرض خطر بالایی می‌باشند. عادت‌های غذایی خاص از جمله مصرف شیر خام و گوشت نیم پخته نیز، خطر ابتلا را افزایش می‌دهند (۳۰). تماس با پرندگان و تولیدات آن‌ها به عنوان مهمترین عامل خطرساز برای انتقال کمپیلوباکتر به انسان شناسایی شده است. معمولاً پرندگان نقش معنی‌داری را در عفونت کمپیلوباکتریایی انسان بازی می‌کنند (۲).

تحقیقات زیادی در رابطه با شیوع کمپیلوباکتر در کشورهای اروپایی و امریکا انجام شده است که نشان می‌دهند میزان شیوع آن در طیور بین ۳٪ تا ۹۷٪ است. در گله‌های طیور صنعتی، کمپیلوباکتر به ندرت در پرندگان زیر سه هفته دیده شده است. به صورت مشخص شیوع کمپیلوباکتر در پرندگانی که دوره پرورشی طولانی‌تری دارند بیشتر است (۲۷). شیوع بالای کمپیلوباکتر در گله‌های طیور در مرحله پرورش، سبب ایجاد فرصت‌های متعددی در ایجاد آلودگی متقاطع در طی کشتار و فرآوری گوشت می-گردد (۲۳). محل اصلی کلونیزه شدن باکتری در سیکوم پرنده است که بهترین مکان برای نمونه برداری می‌باشد (۱۹). در صورتی که تعداد ارگانیسم در نمونه اندک باشد، استفاده از محیط کشت غنی-کننده نیز ضروری است (۲۲).

در این بررسی میزان آلودگی طیور گوشتی شهرستان شیراز در پایان دوره پرورش به کمپیلوباکتر با روش کشت مستقیم و غنی‌سازی قبل از کشت صورت گرفت. همچنین تأثیر غنی‌سازی در جداسازی باکتری ارزیابی شده است.

روش کار

جمع‌آوری نمونه

طی ۴۱ بار مراجعه به کشتارگاه‌های طیور شهرستان شیراز، به طور تصادفی ۱۰۰ مرغداری انتخاب و از هر مرغداری ۲۱ لاشه انتخاب و سیکوم آن‌ها در شرایط اسپتیک برداشته شد و در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال یافته و در همان روز مورد آزمایش قرار گرفتند.

کشت نمونه‌ها: در آزمایشگاه نمونه‌ها در شرایط اسپتیک باز شدند و به اندازه یک لوپ از محتویات آن‌ها برداشته شد. محتویات هر ۷ سیکوم با هم مخلوط و به یک شیشه یونیورسال حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط TSB (مرک، آلمان) منتقل شد (از هر

مرغداری سه نمونه مخلوط تهیه می‌شد). نمونه‌ها توسط ورتکس به مدت ۲ دقیقه به خوبی مخلوط و همگن شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی هر لوله جمع‌آوری و پس از عبور دادن از فیلتر ۰/۸ nm (میلوپار، امریکا)، مایع فیلتر شده به دو روش به شرح زیر کشت شدند:

۱) کشت به میزان ۰/۱ ml در محیط کمپیلوباکتر سلکتیو آگار (مرک، آلمان) حاوی آنتی بیوتیک‌های آمفوتریپسین B، ریفامپیسین، تریمتوپریم، ونکومایسین و سفتریاکسون از هر کدام به اندازه ۱۰ mg/L و ۵٪ خون همولیز شده گوسفند (برای همولیز شدن خون، سه بار منجمد و دیفراست گردید). پلیت‌ها در شرایط میکروآئرو فیلیک ایجاد شده با گازپک C (مرک، آلمان) به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C و سپس ۴۴ ساعت در دمای ۴۲ °C انکوبیت شدند. سپس از پرگنه‌هایی که از نظر ریخت‌شناسی مشکوک به کمپیلوباکتر بودند (کلنی‌های کوچک، مسطح تا محدب و به رنگ خاکستری تا قهوه‌ای) رنگ‌آمیزی گرم انجام و در صورت تأیید ریخت شناسی میکروسکوپی (باکترهای میله‌ای شکل خمیده یا مارپیچی و گرم منفی)، کلنی-های منفرد انتخاب و با کشت مجدد خالص شدند.

۲) کشت به میزان ۰/۲ ml در محیط کشت TSB غنی شده با ۲/۵٪ دکستروز، ۱/۵٪ تیوگلیکولات سدیم و حاوی آنتی بیوتیک‌های آمفوتریسین B، ریفامپیسین، تری متوپریم، ونکومایسین و سفتریاکسون از هر کدام به اندازه ۱۰ mg/L. نمونه‌ها در شرایط مشابه شرایط فوق الذکر به مدت ۴۸ ساعت انکوبیت شدند. سپس از هر نمونه در محیط کمپیلوباکتر سلکتیو آگار غنی شده (مشابه فوق) کشت خطی داده شدند و انکوبیت گردیدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، پلیت‌ها چک شدند و پس از رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی، نمونه‌های مشکوک خالص‌سازی شدند.

کلیه نمونه‌های خالص‌سازی شده جهت تشخیص جنس و گونه‌های ژژونی و کولای مورد آزمایش multiplex PCR قرار گرفتند (۳).

روش مولکولی

تمام مراحل انجام multiplex PCR براساس مطالعه انصاری و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد (۳). به طور خلاصه از پرایمر 5′-CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG-3′ و 5′-GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT-3′ به منظور شناسایی ژن *mapA* و پرایمر 5′-AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG-3′ و 5′-TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG-3′ به منظور شناسایی ژن *ceuE* استفاده گردید. برنامه دمایی به صورت 95 درجه سانتی گراد 10 دقیقه، 35 چرخه دمایی به ترتیب 95 درجه سانتی گراد، 59 درجه سانتی گراد و ۷۲ درجه سانتی گراد هر یک به مدت ۱ دقیقه و در ادامه مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه تنظیم شد. محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز الکتروفروز گردید و بر اساس پرایمر انتخاب شده طول باند با اندازه ۵۸۹ جفت باز کمپیلوباکتر ژژونی و طول باند با اندازه ۴۶۵ جفت باز کمپیلوباکتر کولای در نظر گرفته شد.

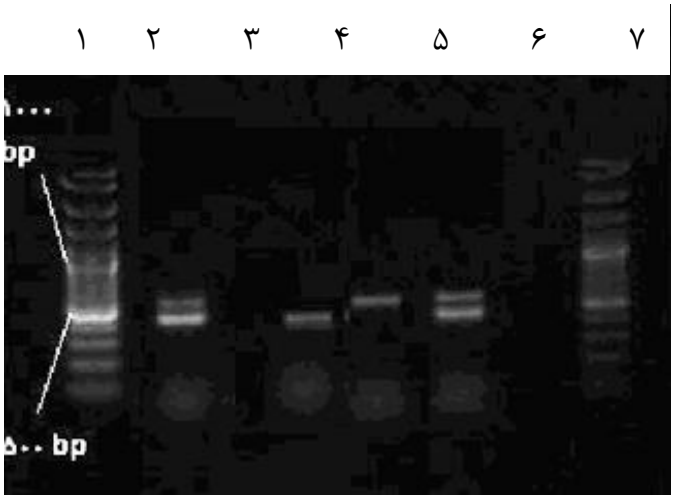
تجزیه و تحلیل‌های آماری

فراوانی موارد مثبت در هر یک از سه روش با آزمون آماری مک‌نمار و با استفاده از برنامه SPSS، نسخه ۱۶ مقایسه شدند.

نتایج

در آزمایش کشت مستقیم در محیط کمپیلوباکتر سلکتیو آگار، از ۳۰۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۱۷۲ مورد مثبت (۵۷/۳٪) تشخیص داده شد که تعداد ۱۶۱ مورد (۵۳/۷٪) با انجام آزمایش PCR تأیید شدند (تصویر ۱). در آزمایش غنی‌سازی در براث قبل از کشت در محیط آگار، از ۳۰۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۱۹۶ مورد مثبت (۶۵/۳٪) تشخیص داده شد که تعداد ۱۸۰ مورد (۶۰/۰٪) با انجام آزمایش PCR تأیید شدند (تصویر ۱). همچنین میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژژونی ۳۱/۳٪ تا ۳۵/۰٪ و کمپیلوباکتر کولای ۳۶/۷٪ تا ۴۰/۰٪ بدست آمد.

آنالیز آماری نتایج نشان داد که روش مورد استفاده تأثیر معنی‌داری در تشخیص دارد (p=۰/۰۰۰۱) (جدول ۱). از آنجا که نمونه‌ها مربوط به ۱۰۰ واحد مرغداری بودند، در آزمایش کشت مستقیم ۷۰ مرغداری و در روش غنی‌سازی قبل از کشت در محیط آگار ۷۶ واحد مرغداری آلوده تشخیص داده شدند. آنالیز آماری نشان داد که روش مورد استفاده تأثیر معنی‌داری در تشخیص مرغداری‌های آلوده دارد (p=۰/۰۴۱) (جدول ۲).



تصویر ۱. تشخیص کمپیلوباکتر کولای (۴۶۲ جفت باز) و کمپیلوباکتر ژژونی (۵۸۹ جفت باز) با روش multiplex PCR در نمونه‌های سکوم جوجه‌های گوشتی: ۱- مارکر ۱۰۰ جفت باز، ۲- کنترل مثبت (مخلوط هر دو گونه)، ۳- کنترل منفی، ۴- کنترل مثبت (گونه کمپیلوباکتر کولای)، ۵- کنترل مثبت (گونه کمپیلوباکتر ژژونی)، ۶- نمونه حاوی هر دو گونه کمپیلوباکتر، ۷- مارکر DNA (۱۰۰bp)

جدول ۱. مقایسه دو روش جداسازی کمپیلوباکتر ژوژونی و کولای از سیکوم طیور در پایان دوره پرورش

	C. jejuni		C. coli		هر دو گونه		مجموع	
روش جداسازی	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کشت مستقیم در پلیت و تأیید با PCR	۵۱	۱۷/۰	۶۷	۲۲/۳	۴۳	۱۴/۳	۱۶۱	۵۳/۷
غنی‌سازی در محیط براث، کشت در پلیت و تأیید با PCR	۶۰	۲۰/۰	۷۵	۲۵/۰	۴۵	۱۵/۰	۱۸۰	۶۰/۰
P value	۰/۰۰۸		۰/۰۱۳		۰/۴۸۰		۰/۰۰۰	

تعداد نمونه ۳۰۰

جدول ۲. فراوانی آلودگی ۱۰۰ واحد مرغداری گوشتی در پایان دوره پرورش به کمپیلوباکتر ژوژونی و کولای براساس روش‌های جداسازی متفاوت

	C. jejuni		C. coli		هر دو گونه		مجموع	
روش جداسازی	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کشت مستقیم در پلیت و تأیید با PCR	۲۴	۲۴	۲۵	۲۵	۲۱	۲۱	۷۰	۷۰
غنی‌سازی در محیط براث، کشت در پلیت و تأیید با PCR	۲۶	۲۶	۲۸	۲۸	۲۲	۲۲	۷۶	۷۶
P value	۰/۴۸۰		۰/۲۵۰		۱		۰/۰۴۱	

بحث

در بررسی حاضر با توجه به روش بررسی ۵۳/۷٪ تا ۶۰/۰٪ نمونه‌ها از نظر آلودگی به دو گونه‌ی کمپیلوباکتر ژژونی و یا کمپیلوباکتر کولای مثبت بودند. در این بین برآورد میزان آلودگی به کمپیلوباکتر ژژونی ۳۱/۳٪ تا ۳۵/۰٪ و کمپیلوباکتر کولای ۳۶/۷٪ تا ۴۰/۰٪ بود که سطح بالایی از آلودگی را نشان می‌دهد.

در برخی بررسی‌های مربوط به جداسازی کمپیلوباکترها از مدفوع طیور، ۳۰٪ تا ۱۰۰٪ آن‌ها حامل کمپیلوباکتر به صورت فلور نرمال دستگاه گوارش گزارش شده‌اند (۸). در بررسی افتخار و همکاران (۲۰۰۷) ۴۸٪ از نمونه‌های گوشت مرغ در پاکستان آلوده به کمپیلوباکتر بودند. در مطالعات مختلف آمارهای متفاوتی از جداسازی کمپیلوباکترها از مرغ به روش کشت گزارش شده است به طوری که جفری و همکاران (۲۰۰۱) ۹۶٪ نمونه‌های گرفته شده از روده ماکیان را از نظر کشت مثبت گزارش کردند. همچنین در بررسی‌ها نشان داده شده که حدود ۸۰٪ گوشت مرغ خام که در کشور انگلستان به فروش می‌رسد، با این باکتری آلوده می‌باشند (۱۱). در همین کشور، مصرف گوشت مرغ آلوده به عنوان عامل ۲۰٪ تا ۴۰٪ عفونت‌های کمپیلوباکتر شناخته شده است (۱۵).

در ایران تا به حال چندین مطالعه در این زمینه صورت گرفته است. از جمله اینکه بخیان و همکاران (۲۰۰۳) در اصفهان میزان آلودگی لاشه را ۲۳/۲٪ برآورد کردند. در حالی که در بررسی هاوایی و همکاران (۲۰۰۸) ۳۱٪ از نمونه‌های مدفوع ماکیان از نظر کشت مثبت بوده‌اند. همچنین جمشیدی و همکاران (۲۰۰۸) میزان آلودگی لاشه طیور را در شهرکرد ۲۸٪ گزارش کردند. طارمی و همکاران (۲۰۰۶) فراوانی کمپیلوباکتر در گوشت مرغ سطح شهر تهران به روش کشت مرسوم را ۱۰٪ بیان نمودند.

در بسیاری از مطالعه‌های انجام شده محیط‌های غنی‌سازی انتخابی نسبت به محیط‌های کشت مستقیم میزان جداسازی کمپیلوباکتر را بهبود بخشیده‌اند (۷ و ۲۸). به طور مثال مارتین و همکاران (۱۹۸۳) با مقایسه روش کشت مستقیم و کشت روی محیط غنی‌سازی به این نتیجه رسیدند که کشت روی محیط غنی‌سازی در مقایسه با کشت مستقیم، میزان جداسازی کمپیلوباکتر را ۴۶/۳٪ افزایش می‌دهد. همچنین محققین دیگر میزان جداسازی کمپیلوباکتر با محیط غنی‌سازی در مقایسه با کشت مستقیم را به ترتیب با ۳۰٪، ۴۰٪ و ۶٪ افزایش گزارش کردند (۹، ۱۰ و ۲۶).

در مطالعه حاضر نیز میزان جداسازی کمپیلوباکتر به وسیله کشت در محیط انتخابی پس از غنی‌سازی در محیط براث نسبت به کشت مستقیم افزایش ۶/۳ درصدی را نشان داد. در ابتدای این مطالعه روش‌های مختلف حذف میکروارگانیزم‌های مزاحم (مثل فیلتر کردن و تغلیظ کردن با سانترفیوژ نمودن نمونه‌ها) و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضد قارچ مختلف و همچنین به کارگیری محیط‌های پایه مختلف مورد استفاده در منابع مختلف بررسی شد و در نهایت روش استفاده شده در روش کار مناسب‌ترین روش در جداسازی باکتری بود.

در این تحقیق بر اساس روش بررسی ۷۰٪ تا ۷۶٪ مرغداری‌های مورد مطالعه در آخر دوره پرورش آلوده به کمپیلوباکترهای بیماری‌زای انسان بودند. از آنجا که بسیاری از عفونت‌های کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولای ناشی از مصرف گوشت ماکیان می‌باشد و بسیاری مصرف گوشت طیور را عامل اصلی انتقال باکتری به انسان دانسته‌اند، به منظور کنترل آلودگی، شناخت مزارع طیور آلوده و ریسک فاکتورهای ایجاد آلودگی ضروری می‌باشد (۲۵). مطالعات در این زمینه وجود پرندگان وحشی و جوندگان، حضور حیوانات اهلی دیگر در مزرعه‌ی پرورش طیور، آلودگی آب و سن و نژاد مرغ مادر را مطرح کرده‌اند (۴، ۵ و ۱۳). در تحقیق دیگری افزایش طول دوره پرورش و عدم مصرف آنتی-بیوتیک در اواخر دوره پرورش به‌عنوان ریسک فاکتور مطرح شدند (۳). به صورت مشخص شیوع کمپیلوباکتر در پرندگانی که دوره پرورش طولانی‌تری دارند بیشتر است (۲۷). در بررسی‌های دیگر نیز اعلام شد که سن پرندگان در زمان نمونه‌گیری مهم-ترین عامل در وقوع آلودگی شناخته شد (۱۲ و ۲۱).

در یک مقاله مروری در کشور انگلستان کارکنان مزارع، حضور سایر حیوانات و وجود چندین سالن در مزرعه ریسک فاکتورهای مهمی تشخیص داده شدند (۱). برخی محققین روش گندزدایی نامناسب، نزدیک بودن واحدهای پرورشی به هم، فصل، اشکال در سیستم امنیت زیستی و ترکیب ناهماهنگ سنی در گله را از فاکتورهای خطر مهم دانسته‌اند (۲۳). عوامل بالقوه دیگر شامل بستر کهنه، آب آلوده، وجود حیوانات دیگر در مزرعه، حیوانات خانگی، پرندگان وحشی، حشرات، تجهیزات و وسایل حمل و نقل و کارگران مزرعه هستند (۲۷).

با توجه به آلودگی زیاد گله‌های مرغ به کمپیلوباکترهای عفونت‌زای انسان، به نظر می‌رسد برای کنترل آن در انسان علاوه بر رعایت موارد فوق، رعایت بهداشت در کشتارگاه‌ها از جمله جایگزینی روش تخلیه احشاء اتوماتیک به جای روش دستی فعلی مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شیراز انجام شده است که بدینوسیله قدردانی می‌شود. از مدیران مرغدارهای شهرستان شیراز و مسئولین کشتارگاه‌های طیور که امکان نمونه‌گیری و انجام این تحقیق را مهیا نمودند و همچنین از آقای غلامعلی نیک‌نیا به خاطر همکاری در انجام آزمایش‌ها تشکر می‌شود.

منابع

1. Adkin, A., Hartnett, E., Jordan, L., Newell, D., Davison H. (2006). Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. *Applied Microbiology,* **100**: 306–315.
2. Anonymous (2005). Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, Second Report on *Campylobacter*. *Food Standard Agency*, P. 185.

3. Ansari-Lari, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S.S., Abdollahi, M., Berizi, E. (2011). Prevalence and risk factors associated with campylobacter infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran. *International Journal of Food Microbiology,* **144**: 475–479.
4. Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M. (2007). Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. *Journal of Food Protection,* **70**: 1820-1828.
5. Barrios, P.R., Reiersen, J., Lowman, R., Bisaillon, J., Pascal, M., Fridriksdottir, V., Gunnarsson, E., Stern, N., Berke, O., McEwen, S., Marti, W. (2006). Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks in Iceland. *Preventive Veterinary Medicine,* **74**: 264–278.
6. Blackburn, C.W., McClure, P.J. (2002). Food-borne Pathogens, 1st Edition. Wood Head Publishing Ltd. London, UK.
7. Blaser, M.J.D., Ivor, M.B., Berkowitz, F.M., Laforce, J., Cravens, L.B., Wang, L. (1979). *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiological features. *Annals of International Medicine,* **91**: 179-185.
8. Bokhyan, M., Salehi, R., Shahraki, S., Aghbal, M. (2003). Detecting enteropathogenic Campylobacters in chicken feces by PCR and comparing with culture method. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences,* **5:** 4-11.
9. Bollton, F.J., Robertson L. (1982). A selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni. Journal of Clinical Pathology,* **35**: 462-467.
10. Chan, F.T.H., Mackenzie A.M.R. (1982). Enrichment medium and control system for isolation of *Campylobacter fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **15**: 12-15.
11. Corry, J., Atabay, H. (2001). Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Applied of Microbiology,* **90**: 96–114.
12. Evans, S.J., Sayers A.R. (2000). A longitudinal study of *Campylobacter* infection of the broiler flocks in Great Britain. *Preventive of Veterinary Medicine,* **46**: 209-223.
13. Guerin, M.T., Martin, W., Reiersen, J., Berke, O., McEwen, S.A., Bisaillon, J.R., Lowman, R. (2007). A farm-level study of risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **49**: 18-19.
14. Havaei, S.A., Pishva, E., Tabibian, A., Rabani, M., Haghshenas, F., Narimani, T. (2008). Cytolethal distending toxin (CDT) produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chickens by tissue culture method in Isfahan. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, **3**: 17-23.
15. Havelaar, A.H., Mangen, M.J.J., de Koeijer, A.A., Bogaardt, M.J., Evers, E.G., Jacobs-Reitsma, W.F. van Pelt, W., Wagenaar, J.A., de Wit, G.A., van der Zee, H., Nauta, M.J. (2007). Effectiveness and efficiency of controlling Campylobacter on broiler chicken meat. *Risk Analysis*, **27**: 831-844.
16. Iftikhar, H., Muhammad, S.M., Masood, A., Ahar K. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiology*, **24**: 219-222.
17. Jamshidi, A., Bassami, M. R., Farkhondeh, T. (2008). Isolation and identification of *Campylobacter* spp. and *Campylobacter coli* from poultry carcasses by conventional culture method and multiplex PCR in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **9 (2)**: 23-24.
18. Jeffry, S.J., Tonooka,K.H., Lozano J. (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp. from skin, crop and intestine of commercial broiler chicken carcasses at processing. *Poultry Science*, **80**: 1390-1392.
19. Jordan, F.T.W., Pattison M. (2002). Poultry Diseases 5th Edition, Saunders Company Ltd. London, UK.
20. Martin, W., Patton, C., Morris, G., Potter, M., Puhr N. (1983). Selective enrichment broth medium for isolation of *Campylobacter jejuni. Journal of Clinical Microbiology*, **5**: 853-855.
21. McDowell, S.W.J., Menzies, F.D., McBride, S.H., Oza, A.N., McKenna, J.P., Gordan, A.W., Neill S.D. (2008). *Campylobacter* spp. in conventional broiler

flocks in North Ireland: epidemiology and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, **84**: 261-276.

22. Monfort, D., Stills, H., Bech-nielsen, S. (1988). Comparison of broth enrichment and direct plating for the isolation of *Campylobacter jejuni* from dog. *Journal of Clinical Microbiology*, **11**: 2246–2247.
23. Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S.G., Fanning, S.A., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Mégraud, F., Millar, C.B., O'Mahony, R., O'Rordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., Whyte, P. (2005). Campylobacter. *Veterinary Research*, **36**: 351–382.
24. Nayak, R., Stewart, T.M., Nawas, M.S. (2005). PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Molecular and Cellular Probes*, **19**: 187-193.
25. Rivoal, K., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colon, P., Ermel G. (2005). Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broilers farms and comparison with isolates of various origins. *Applied and Environmental Microbiology*, **7**: 6216-6227.
26. Rogol, M., Shapak, B., Rothman, D., Sechter I. (1985). Enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni-Campylobacter coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1**:125-126.
27. Saif, Y.M. (2008). Diseases of Poultry 12th Edition, Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK.
28. Tanner, E.I., Bullin C. H. (1977). *Campylobacter* enteritis. *British Medical Journal*, **2**: 579-580.
29. Taremi, M., Dallal, M., Gachkar, L., Moez Ardalan, S., Zolfagharian, K., Zali M.R. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. *Food Microbiology*, **108**: 401–403.
30. Varnam, A.H., Evans M.G. (1991). Food-borne Pathogens. Wolfe Publishing Ltd, London, UK.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 1, 2017

Study of the contamination of broiler-chicken flocks to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* at the end of a rearing period

Berizi, E.[1], Shekarforoush, S.S.[2*], Hosseinzadeh, S.[3], Abdollahi, M.[1]

1. Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received Date:2 October 2015 *Accepted Date: 30 May 2017*

Abstract

C. jejuni and C. coli are considered as major causes of bacterial enteritis in human, worldwide. Birds are playing a substantial role in the transmission of infection. A relatively high prevalence of the infection in the rearing period leads to the cross-contamination during the slaughter processes which coincidently cause the contamination of poultry meat products. Investigation on the contamination of poultry carcasses at the end of rearing periods to C. jejuni and C. coli. In autumn 1388, total of 100 poultry farms were randomly selected, from which, 21 carcasses were chosen to collect a cecal specimen from each carcass. Each cecal contents of seven carcasses were then pooled, culture on a selective agar plate and enriched in a selective broth medium followed by culture on a selective agar plate. The isolates were finally confirmed using a multiplex-PCR assay. Total of 53.7% (70% of all the farms) were found positive using direct culture plating, whereas, 60% (76% of the farms) were positive when the samples were initially enriched in a selective broth. 31.3% to 35% and 36.7% to 40.0% of all the positives were respectively confirmed as C. jejuni and C. coli. A 6.3% increase in the isolation rate of Campylobacter, when the samples were initially enriched in the selective broth, was demonstrated. The present study revealed a considerable high prevalence of Campylobacter in poultry farms, and thus, a closer investigation on the possible risk factors involving in the contamination is essential. Furthermore, to reduce the risk of infection in human, improving the hygienic inspection in the poultry slaughter houses, is also recommended.

Keywords: Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, broiler-chicken, multiplex PCR

**Corresponding author: Seyed Shahram Shekarforoush*
Address: Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Tel: +98 7132286950
Email: shekar@shirazu.ac.ir