

UNIVERSITETI I PRISHTINËS “HASAN PRISHTINA”
FAKULTETI I BUJQËSISË DHE VETERINARISË
DEPARTAMENTI BIOTEKNOLOGJI NË ZOOTEKNI
PROGRAMI: SHKENCAT E APLIKUARA NË ZOOTEKNI



PUNIMI I DIPLOMES - MASTER

**Prevalenca e *Campylobacter spp* në mishin e freskët të pulës në tregun e
Prishtinës**

Mentore:

Prof. Asoc. Dr. Alltane Kryeziu

Kandidati:

Bsc.Vehbi Seferaj

Prishtinë, Korrik 2023

PËRMBLEDHJE

Siguria dhe cilësia e ushqimeve janë pjesë e pandashme e diskutimeve që sot ka bota. Kontaminimi më patogjenë është një nga çështjet më shqetësuese të sigurisë së ushqimit. Speciet *Campylobacter spp.* janë patogjenë të zakonshëm bakterial që shkaktojnë gastroenterit në mbarë botën. Konsumimi i mishit të shpendëve dyshohet të jetë shkaku kryesor i kësaj sëmundje. Prandaj duke pasë parasysh që importi i mishit të shpendëve në Kosovë është mjaft i lartë, si dhe praktikat e transportit të shpendëve nuk aplikohen me përpikëri është parë e nevojshme të bëhet një hulumtim lidhur me praninë e *Campylobacterit* në mishin e pulës. Kështu që qëllimi i këtij hulumtimi është vlerësimi i sigurisë së mishit të pulës të prodhuar dhe tregëtuar në regjionin e Prishtinës.

Për të përcaktuar aspektin e sigurisë së mishit të freskët të pulës në tregun e këtij regjioni është bërë analizimi i numrit të përgjithshëm të bakterieve mezofile dhe detektimi i *Campylobacter spp.* në mishin e freskët. Për të analizuar dhe detektuar praninë apo jo të baktereve mezofile dhe *Campylobacterit spp.* është përdorur metodën e bazuar në ADN, reaksioni zinxhirorë i polimerizimit ose PCR. Mostrat e mishit të pulës janë mbledhur në disa markete në Prishtinë në muajin Shtator-Tetor 2020. Të gjitha mostrat e marra kanë qenë brenda afatit të skadencës. Deri në momentin e analizimit në aspektin mikrobiologjik mostrat janë ruajtur në frigorifer 2-8°C. Numri i mostrave ka qenë 50, prej tyre 31 kanë qenë mish i bardh i pulës, 16 kofsha pule dhe 3 kofsh/shpatull. Mostra e mishit të freskët të pulës, janë analizuar për praninë e baktereve totale mezofile të mbjelluara në Plate Count Agar (PCA) dhe *Campylobacter spp.* të mbjellur në CEBB (Campylobacter Enrichment Broth Base). Mediumit për izolim të *Campylobacterit* i është shtuar edhe shtojca (Campylobacter Preston supplement). Mediumet janë përgaditur në ditën kur janë marrë mostrat pasi që PCA dhe CEBB duhen të përgaditen të freskëta. Të gjitha enët tjera laboratorike epruvetat, pipetat e punës, enët tjera janë larë dhe sterilizuar në autoklav në temperaturë prej 121°C, presion 1.5 atmosfera për 15 minuta.

Metoda e mbjelljes me shtrirje në pllakë është përdorur për rritje të baktereve mezofile, bakteret totale mezofile janë rritur në temperaturë 30°C për 48 orë, ndërsa *Campylobacter spp.* Në temperaturë 37°C për 48 orë të vendosura së bashku më mediumin ushqyes CEBB në qeset Stomacher. Detektimi i prezencës së *Campylobacter-it spp.* do të bëhet duke u bazuar në ngjyrën fluroshen të SYBR Green, për të cilën skanohen mostrat për secilin cikël të përfunduar. Në këtë hulumtim janë përdorur primer specifik që targetojnë gjene të *Campylobacter spp.* Të gjitha mostrat janë lexuar si duplikate dhe janë përfshirë kontrollat e brendshme. Leximi i mostrave është

bërë me pajisjen Roter G nga Qiagen duke analizuar përmes software të kompanisë Qiagen. Në bazë të rezultateve të fituara; numri i përgjithshëm i baktereve mezofile në mishin e kofshëve sillet prej 4.66 log cfu/gr deri në 5.18 log cfu/gr, ku mesatarja për 14 mostrat është 4.876 log cfu/gr. Në mostrat e mishit të bardhë numri i përgjithshëm i baktereve mezofile sillet prej 5.04 log cfu/gr deri në 6.83 log cfu/gr, ku mesatarja për 31 mostrat është 5.681 log cfu/gr. Ndërsa mostrat kofshë – shpatull, numri i përgjithshëm i baktereve mezofile sillet prej 3.56 log cfu/gr deri në 4.38 log cfu/gr, ku mesatarja për 5 mostrat është 3.976 log cfu/gr.

Në bazë të analizave statistikore, rezulton se kemi diferencë në mes llojit të mostrave. Kjo mund të shpjegohet me faktin se numri i mostrave për llojet e mishit nga pjesët e ndryshme nuk është i njëjtë dhe logjikisht sa më i madh numri i mostrave të analizuara, rezultatet do të tregojnë saktësi më të madhe rreth kontaminimit me llojet e ndryshme të baktereve. Pas ekstrahimit të ADN- së është matur koncentracioni i ADN- së me biofotometër (ependorf BioPhotometer plus). Një njësi e densitetit optik në 260 nm në Biofotometër, është vlerë ekuivalente me 40-50 ng/μl e koncentracionit të ADN-së. Në bazë të rezultateve të fituara, të cilat janë dhënë në tabelën 6, në punimin tonë shohim se procesi i ekstrahimit është kryer mjaft mirë, që do të thotë se kemi mjaftueshëm ADN për të vazhduar me analizën e PCR- së. Rezultatet e fituara nga analizat e detektuara me PCR nga të cilat 18 ose 36% e totalit të mostrave ishin negative me *Campylobakter* dhe 32 ose 64% e mostrave tjera ishin më pak ose më shumë të kontaminuara me *Campylobakter*. Pjesa më e ndotur e mishit të pulës me *Campylobakter* ishte mishi i kofshës, e që vijon me kofsh-shpatullën ndërsa pjesa e mishit të bardhë ka treguar numër më të lartë të mostrave negative në krahasim më pjesët tjera të mishit të freskët të pulës që është përfshirë në këtë hulumtim, ndoshta kjo për faktin që edhe kishte numër më të lartë të mostrave të përfshiera mbrënda llojit. Ndërsa nga rezultatet e fituara në aspektin e brendeve kemi këtë renditje, brendi III është brendi më shumë i ndotur me *Campylobakter spp.* për të vazhduar pastaj me brendin II dhe brendin I i cili kishte paraqitje shumë më të mirë për nga ndotja me *Campylobakter*. Duke u bazuar në të dhënat e fituara nga ky hulumtim, mund të konstatohet se inkubimi i mostrave me mediumin PCA në temperaturë 30°C për 48 orë, ka rezultuar efektiv për rritjen/pasurimin e *Campylobakter-it*. Ekstrahimi i ADN-së duke u bazuar në kitin mericon DNA Bacteria Plus Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), është kryer mjaft mirë dhe sasia e ADN- së së ekstrahuar nga mostrat ka qenë e mjaftueshme për amplifikim. Në këtë periudhë duke e marrë parasysh edhe situatën me Covid-19, mishi i pulës në rajonin e Prishtinës paraqet një dozë rreziku sa i përket *Campylobakter-it*. Pasi që numri i mostrave

të mbledhura për lloj ishte relativisht i vogël dhe rekomandojmë që të bëhen hulumtime të tjera me numër më të madh të mostrave dhe për një periudhë më të gjatë sesa kohëzgjatja e mbledhjes së mostrave për këtë punim. Gjithashtu është e nevojshme që një hulumtime të tilla të bëhen më shpesh në mënyrë që të përcillet trendi i sigurisë së mishit të pulës në tregun kosovarë.

Rekomandimet tona lidhur me këtë hulumtim janë që institucionet përgjegjëse për sigurinë ushqimore (Instituti Kombëtar i Shëndetit Publik dhe Agjencioni i Ushqimit dhe Veterinarisë) në Republikën e Kosovës, të ketë si kontrollë rutinore edhe analizat mikrobiologjike të mishit të pulës për prezencën e *Campylobacter spp.*

Fjalët kyçe: *Campylobacter spp.*, Mishi i fresket i pulës, PCR, ADN.

UNIVERSITY OF PRISHTINA “HASAN PRISHTINA”
FACULTY OF AGRICULTURE AND VETERINARY
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY IN ZOOTECHNY
PROGRAM: APPLIED ANIMAL SCIENCE



MASTER DIPLOMA THESIS

Prevalence of Campylobacter spp in fresh chicken meat in the market of Pristina

Supervisor:

Prof. Asoc. Dr. Alltane Kryeziu

Candidate:

Bsc. Vehbi Seferaj

Prishtinë, July 2023

ABSTRACT

Food safety and quality are an inseparable part of the world's discussions today. Pathogen contamination is one of the most worrisome food safety issues. The species *Campylobacter* spp. are common bacterial pathogens that cause gastroenteritis worldwide. The consumption of poultry meat is suspected to be the main cause of this disease. Therefore, taking into account that the import of poultry meat in Kosovo is quite high, as well as poultry transport practices are not strictly applied, it was deemed necessary to conduct a research regarding the presence of *Campylobacter* in chicken meat. So the purpose of this research is to evaluate the safety of chicken meat produced and marketed in the region of Pristina. To determine the safety aspect of fresh chicken meat in the market of this region, the analysis of the total number of mesophilic bacteria and the detection of *Campylobacter* spp. in fresh meat. To analyze and detect the presence or not of mesophilic bacteria and *Campylobacter* spp. the DNA-based method, the polymerase chain reaction or PCR, was used. Chicken meat samples were collected in several markets in Pristina in September-October 2020. All samples taken were within the expiration date. Until the moment of microbiological analysis, the samples were stored in a refrigerator at 2-8°C. The number of samples was 50, of which 31 were white chicken meat, 16 chicken thighs and 3 thighs/shoulders. Fresh chicken meat samples were analyzed for the presence of total mesophilic bacteria seeded on Plate Count Agar (PCA) and *Campylobacter* spp. planted in CEBB (*Campylobacter* Enrichment Broth Base). A supplement (*Campylobacter* Preston supplement) has been added to the *Campylobacter* isolation medium. Media were prepared on the day the samples were taken as PCA and CEBB should be prepared fresh. All other laboratory vessels, test tubes, working pipettes, other vessels were washed and sterilized in an autoclave at a temperature of 121°C, pressure of 1.5 atmospheres for 15 minutes. The plate spreading method was used to grow mesophilic bacteria, total mesophilic bacteria were grown at 30°C for 48 hours, while *Campylobacter* spp. At 37°C for 48 hours placed together with CEBB nutrient medium in Stomacher bags. Detection of the presence of *Campylobacter* spp. will be based on the SYBR Green fluorescence for which samples are scanned for each cycle completed. In this research, specific primers were used that target genes of *Campylobacter* spp. All samples were read in duplicate and internal controls were included. The reading of the samples was done with the Roter G device from Qiagen analyzing through the software of the Qiagen company. Based on the results obtained; the total number of mesophilic bacteria in thigh meat

ranges from 4.66 log cfu/gr to 5.18 log cfu/gr, where the average for the 14 samples is 4.876 log cfu/gr. In the white meat samples, the total number of mesophilic bacteria ranges from 5.04 log cfu/gr to 6.83 log cfu/gr, where the average for the 31 samples is 5.681 log cfu/gr. While the thigh - shoulder samples, the total number of mesophilic bacteria ranged from 3.56 log cfu/gr to 4.38 log cfu/gr, where the average for the 5 samples is 3.976 log cfu/gr.

Based on the statistical analysis, it turns out that there is a difference between the type of samples. This can be explained by the fact that the number of samples for the types of meat from different parts is not the same and logically the greater the number of samples analyzed, the results will show greater accuracy about the contamination with different types of bacteria . After DNA extraction, DNA concentration was measured with a biophotometer (Eppendorf BioPhotometer plus). One unit of optical density at 260 nm in the Biophotometer is equivalent to 40-50 ng/ μ l of DNA concentration. Based on the obtained results, which are given in table 6, in our paper we see that the extraction process was carried out quite well, which means that we have enough DNA to proceed with the PCR analysis. The results obtained from the analysis detected by PCR from which 18 or 36% of the total samples were negative with *Campylobacter* and 32 or 64% of the other samples were more or less contaminated with *Campylobacter*. The most contaminated part of the chicken meat with *Campylobacter* was the thigh meat, followed by the thigh-shoulder, while the white meat part showed a higher number of negative samples compared to other parts of fresh chicken meat which is included in this research, perhaps this is due to the fact that there was a higher number of samples included within the type. While from the results obtained in terms of brands we have this ranking, brand III is the brand most contaminated with *Campylobacter* spp. to then continue with brand II and brand I, which had a much better performance in terms of *Campylobacter* contamination. Based on the data obtained from this research, it can be concluded that the incubation of samples with PCA medium at 30°C for 48 hours has been effective for the growth/enrichment of *Campylobacter*. DNA extraction based on the mericon DNA Bacteria Plus Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) performed well and the amount of DNA extracted from the samples was sufficient for amplification. In this period, taking into account the situation with Covid-19, chicken meat in the Pristina region presents a dose of risk in terms of *Campylobacter*. Since the number of samples collected per species was relatively small, we recommend that other research be done with a larger number of samples and for a longer period than the duration of sample collection for this paper. It is also necessary that such research be done more often in order

to follow the trend of chicken meat safety in the Kosovar market. Our recommendations related to this research are that the institutions responsible for food safety (the National Institute of Public Health and the Food and Veterinary Agency) in the Republic of Kosovo, have as a routine control microbiological analyzes of chicken meat for the presence of *Campylobacter* spp.

Key words: *Campylobacter* spp, Fresh chicken meat, PCR, DNA.