بررسی میزان شیوع فصلی کمپیلوباکتر ججونای و کمپیلوباکترکولای در شیرهای خام شهرستان آمل با استفاده از روش M. PCR

عباس توکلی واسکس[1]، گیتی کریم[2]، مهدی شریفی سلطانی[3]، داود نصیری[4]، هادی پورجعفر[5] *

[1] مدرس گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت الله آملی، آمل، ایران
[2] استاد دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[3] عضو هیات علمی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، چالوس، ایران
[4] عضو هیات علمی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نقده، نقده، ایران
[5] دانشجوی دوره‌ی Ph.D بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1391/2/25 تاریخ پذیرش: 1391/5/2

چکیده

در این مطالعه، تعداد 138 نمونه شیر از مراکز جمع آوری شیر شهرستان آمل در هر فصل سال (1389) و به روش تصادفی ساده، تهیه شدند. نمونه ها در شرایط سرما به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس، نمونه ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت آبگوشت غنی کننده *کمپیلوباکتر* تحت شرایط میکروآئروفیلیک در دمای 42 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت زمان 48 ساعت گرمخانه گذاری شدند. محیط‌های غنی شده به داخل یک محیط کشت انتخابی بر پایه‌ی blood agar انتقال یافتند و دوباره تحت شرایط ذکر شده گرمخانه گذاری شدند. سپس، DNA باکتری از یک میلی لیتر آبگوشت غنی کننده استخراج گردید. ردیابی و شناسایی گونه‌های *کمپیلوباکتر* با روش Multiplex PCR و با استفاده از ژن اختصاصی گونه *ججونای* و *کولای* صورت پذیرفت. DNA ladder 100 pb به عنوان یک Reference Size برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR برای گونه‌ی ججونای 160 pb و برای گونه‌ی کولای 894 bp با ژل الکترفورز شناسایی شد. از مجموع 138 نمونه در هر فصل در فصل بهار، *ک. ججونای* 6/6 درصد و *ک.کولای* 1/5 درصد، در فصل تابستان، *ک. ججونای* 11/6درصد و *ک.کولای* 3/7 درصد، در فصل پاییز، *ک. ججونای* 5/1 درصد و *ک.کولای* 2/2 درصد، در فصل زمستان *ک. ججونای* 2/9 درصد و *ک.کولای* 0/8 درصد تشخیص داده شدند. نتایج این مطالعه، نشان داد که در فصل تابستان، *کمپیلوباکتر ججونای* و *کولای* در بیش ترین میزان شیوع و در فصل زمستان در کم‌ترین میزان شیوع در شیرهای خام شهرستان آمل بودند($p<0.05$).

واژه‌های کلیدی: *کمپیلوباکتر ججونای* ، *کمپیلوباکتر کولای*، شیوع فصلی، PCR، آمل.

* مسوول مکاتبه: pourjafarhadi59@ ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

1- مقدمه

اختلالات گوارشی و اسهال ناشی از باکتری *کمپیلوباکتر* از بیماری‌های عمده در کشورهای در حال توسعه بوده و حتی در کشورهای توسعه‌یافته نیز یکی از علل مرگ و میر بخصوص در کودکان می‌باشند به طوری که در ایالات متحده‌ی آمریکا دو میلیون موارد عفونت از این باکتری در هر سال گزارش می‌شود (1، 2، 3 و4). کمپیلوباکتریوزیس به عنوان یک بیماری مهم مشترک، سهم عمده ای در ایجاد گاستروآنتریت‌های عفونی انسان دارد و در بسیاری از کشورهای دنیا اولین عامل گاستروآنتریت محسوب شده و علاوه بر ایجاد اسهال آبکی و خونی، باعث بیماری‌های ثانویه ای مثل مننژیت، کوله سیستیت و سندرم Guillain Barre هم می‌گردد (4، 5 و6). این باکتری که در قرن نوزدهم توسط Theodor Escherich شناسایی شد ، گرم منفی ، فنری شکل یا خمیده می‌باشد و در دمای 42 درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط میکروآئروفیلیک به خوبی رشد می‌کند و در دمای زیر 25 درجه‌ی سانتی‌گراد رشد آن متوقف می‌شود ولی از بین نمی رود (2و4). گونه‌های ترموفیلیک کمپیلوباکتر مانند *کمپیلوباکتر ججونای* و *کمپیلوباکتر کولای* نقش مهمی در ایجاد بیماری کمپیلوباکتریوزیس دارند که نقش آنها در بروز عفونت‌های غذایی روز به روز پررنگ تر می‌شود به طوری که با توجه به آلودگی‌های اخیر ناشی از کمپیلوباکتر، امروزه آلودگی با این باکتری و مسمومیت‌های ناشی از آن از طریق غذا از اهمیت زیادی برخوردار بوده و حتی درصد آلودگی با این باکتری از سالمونلا نیز بیش تر شده است (2و4). مطالعات، نشان می‌دهد که این باکتری به طور عمده همراه با مواد غذایی با منشأ دامی است (1). شیر خام، شایع ترین علت بیماری‌های روده ای در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به کمپیلوباکتر بوده است که عمدتاً با مدفوع گاو و یا از طریق ورم پستان، آلوده می‌گردد (1). همچنین، گوشت قرمز و طیور، آب های سطحی تصفیه نشده و قارچ‌های خوراکی هم از عوامل عفونت غذایی کمپیلوباکتریوزیس می‌باشند و عمدتاً بیماری در فصل‌های بهار و تابستان شایع می‌باشد (4).

روش PCR به خاطر دقت و حساسیت زیاد و سرعت تشخیص، قادر به تعیین وجود حتی یک باکتری در هر میلی لیتر بوده و در زمان بسیار کوتاهی پاسخ لازم حاصل می‌گردد. از آن جایی که تشخیص باکتری مورد مطالعه به روش کشت در شیر خام مشکل می‌باشد، لذا استفاده از تکنیک PCR جهت بررسی میزان شیوع این باکتری در نمونه‌های شیر خام بسیار مفید و حائز اهمیت می‌باشد. روش PCR جهت تشخیص باکتری کمپیلوباکتر در مطالعات زیادی مورد استفاده قرار گرفته است ولی بر اساس جست وجوی ما، مطالعات کمی در مورد بررسی فراوانی این باکتری در داخل شیر با روش PCR موجود می‌باشد (7و8) و مطالعات عمدتاً در مورد بررسی فراوانی این باکتری در گوشت قرمز و طیور و هم‌چنین در نمونه‌های اسهالی می‌باشند (2، 9، 10، 11 و12).

با توجه به این که شهرستان آمل از شهرستان‌های تفریحی و توریستی کشور به خصوص در فصول گرم سال (تابستان و بهار) می‌باشد و علاوه بر آن یکی از قطب‌های صنعت غذایی کشور نیز به شمار می‌آید، لذا آگاهی از میزان آلودگی مواد غذایی به ویژه شیر خام که ماده‌ی اولیه‌ی ساخت سایر فرآورده‌های شیری است به باکتری‌های عامل عفونت ها و مسمومیت‌های غذایی ضروری می‌باشد. با دانستن میزان آلودگی شیر خام این شهرستان به کمپیلوباکتر و برقراری تمهیدات لازم، علاوه بر کمک به اقتصاد توریستی شهر، می‌توان از وقوع عفونت‌های غذایی از طریق شیر و فرآورده‌های خام حاصل از آن جلوگیری کرده و در نتیجه به ارتقا بهداشت همگانی کمک نمود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع فصلی *کمپیلوباکترججونای* و *کمپیلوباکترکولای* در شیرهای خام شهرستان آمل با استفاده از روش PCR می‌باشد.

2- مواد و روش ها

2-1- سویه باکتری مورد استفاده

در این مطالعه، پرایمرهای *کمپیلوباکترججونای* و *کمپیلوباکترکولای*(شرکت کیاژن) خریداری و برای PCR Optimization و همچنین کنترل مثبت در آزمایش multiplex PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

2-2-جمع آوری نمونه‌های شیرخام

در هر فصل 138 نمونه شیر به روش نمونه گیری تصادفی ساده از چهار سکوی جمع آوری شیر (این چهار سکو عمده

Archive of SID

www.SID.ir

شیر شهرستان آمل را تامین می کنند) جمع آوری شدند. نمونه ها در شرایط سرما به آزمایشگاه منتقل شد.

2-3- غنی سازی نمونه‌های شیر

در آزمایشگاه 10ml شیرخام در شرایط 14000rpm به مدت 20 دقیقه و دمای 5 درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و سپس توده به دست آمده به 45 ml محیط آبگوشت غنی کننده‌ی کمپیلوباکتر انتقال یافت و در شرایط اتمسفر میکروآئروفیلیک (5 درصد اکسیژن، 10 درصد دی اکسیدکربن و 85 درصد نیتروژن) و دمای 42 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرمخانه گذاری شد. محیط آبگوشت غنی کننده شامل نوترینت براث (Merk) و همچنین 10 mg/L تری متوپریم، 5 mg/L ریفامپسین، 2500 IU/L پلی میکسین B، 15 mg/L سفوپرازونل، 2 mg/L آمفوتریسین و با استفاده سلکتات b (SV59 Series-Mast Diagnostics) بود. سپس، محیط‌های غنی شده به داخل یک محیط کشت انتخابی که بر پایه‌ی blood agar بود انتقال یافت که حاوی 7 درصد Lysed horse blood و آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین (10 mg/L)، پلی میکسین B (2500 IU/L)، تری متوپریم (5 mg/L) و به همراه سلکتاویال (SV3 Series-Mast Diagnostics) بود. پلیت ها تحت شرایط اتمسفر میکروآئروفیلیک و در دمای 42 درجه‌ی سانتی‌گراد و مدت زمان 48 ساعت، گرمخانه گذاری شدند (8).

2-4- استخراج DNA

در این مرحله، کلونی‌های یکسان موجود در پلیت ها ی محیط کشت انتخابی بعد از جمع آوری به آب مقطر غیریونی استریل انتقال یافته و مخلوط شد و بعد در داخل بن ماری حاوی آب جوش به مدت 10 دقیقه قرار داده شد. سپس، نمونه ها به مدت 10-5 دقیقه داخل یخ قرار داده شدند تا سریعاً سرد شوند. بعد، تحت شرایط 13000 rpm و به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شدند. جهت انجام آزمایش PCR، مایع رویی حاصل از سانتریفوژ به عنوان الگوهای DNA مورد استفاده قرار گرفتند (8).

2-5- آزمایش Multiplex PCR

ترکیب واکنشی شامل 2/5 µl لاشه لیز شده‌ی باکتری (bacterial Lysate)، 2/5 µl بافر 10×BSA، 2/4 µl ترکیب 10×dNTP، 0/7 µl از هر پرایمر (پرایمرها در جدول 1 نشان داده شده است)، 0/2 µl Taq polymerase (5 U/ µl) و آب غیریونیزه بود و حجم نهائی در حدود 25 µl شد (8).

جدول 1- پرایمرهای PCR استفاده شده برای تشخیص کمپیلوباکتر ججونای و کمپیلوباکتر کولای

Target gene	Sequence (5' → 3')	PCR Product (pb)
cadF- outer membrane protein (Campylobacter spp)	(F) TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG (R) CTA ATA CCY1 AAA GTT GAA AC	400
Oxidoreductase subunit (C. jejuni)	(F) CAA ATA AAR2 TTA GAG GTA GAA TGT (R) GGA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T	160
ceuE-lipoprotein component of enterochelin (C. coli)	(F) ATG AAA AAA TAT TTA GTT TTT GCA (R) ATT TTA TTA TTT GTA GCA GCG	894

سپس، ترکیب واکنشی در ترموسایکلر (TECHNE) تقویت شد و نهایتا PCR طبق شرایط زیر انجام گرفت:

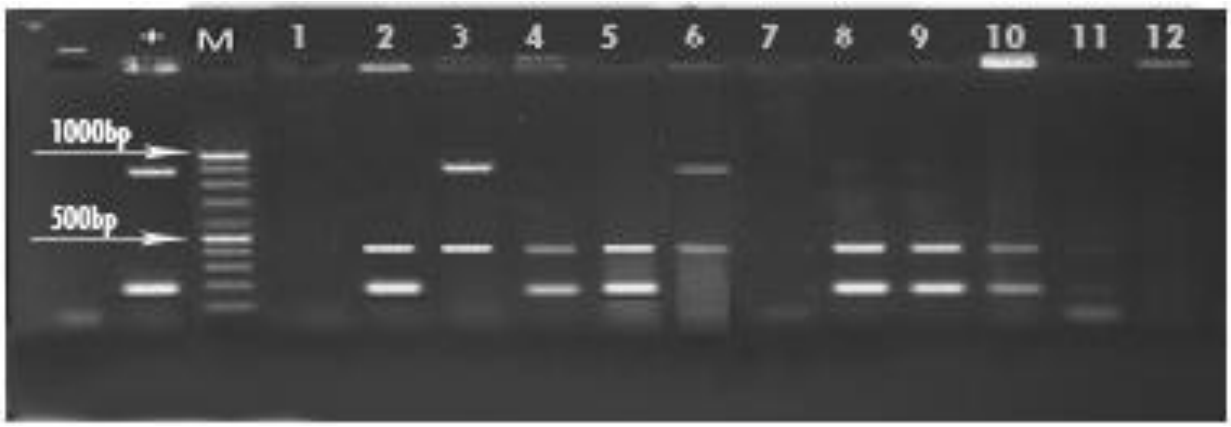
دناتوراسیون حرارتی در دمای 94 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 4 دقیقه، 33 چرخه با دناتوراسیون دمای 94 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه، annealing در دمای 45 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و extension 72 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و final extension 72 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه. محلول PCR به وسیله‌ی الکتروفورز در 1/5 درصد ژل آگار و شرایط V 100 به مدت 40 دقیقه در بافر تریس- استات جداسازی شده و به وسیله‌ی رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده گردید. سپس، به وسیله‌ی UV- transilluminator خوانده شده و به وسیله‌ی gel documentation apparatus مستند شد (8). DNA ladder 100 pb به عنوان یک Size reference برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت (8). ژنومیک DNA استخراج شده از کمپیلوباکتر ججونای

Archive of SID

www.SID.ir

و کولای به عنوان کنترل مثبت در همه مراحل PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

باکتری می‌باشد (4و14). با روش PCR که دقت بسیار بالائی دارد می‌توان تقریباً از حضور یا عدم حضور انواع کمپیلوباکتر مطمئن شد (15، 16، 17 و 18). مزیت این



شکل 1 - کمپیلوباکتری ججونای در بخش 160bp و کمپیلوباکتر کولی در بخش 894bp و کمپیلوباکتر در بخش 400bp قابل مشاهده هستند.

محصول PCR برای کمپیلوباکتر400bp، گونه‌ی ججونای 160pb و برای گونه‌ی کولای bp 894 با ژل الکترفورز شناسایی شد (شکل 1).

2-6- آنالیز آماری

جهت آنالیز آماری داده های به دست آمده از نرم افزار SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) 16.0 و آزمون تی مستقل در سطح $p< 0.05$ استفاده شد.

3- نتایج و بحث

در این بررسی از مجموع 138 نمونه در هر فصل، در فصل بهار، *ک. ججونای* 6/6 درصد و *ک.کولای* 1/5 درصد، در فصل تابستان، *ک.* ججونای 11/6درصد و *ک.کولای* 3/7 درصد، در فصل پاییز، *ک. ججونای* 5/1 درصد و *ک.کولای* 2/2 درصد، در فصل زمستان *ک. ججونای* 2/9 درصد و *ک.کولای* 0/8 درصد تشخیص داده شدند. بر اساس این نتایج، بیش ترین میزان شیوع *کمپیلوباکتر ججونای* و *کمپیلوباکترکولای* در فصل تابستان و کم ترین میزان شیوع در فصل زمستان بودند($p<0/05$).

در موارد متعددی، انتقال عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر به انسان، توسط مصرف شیر خام گزارش شده است (1و13). دوز عفونی این باکتری کم و حدود 500 سلول

روش نسبت به روش‌های کشت میکروبی، دقت بسیار بالا و سرعت زیاد آن در جواب گرفتن است به طوری که در روش کشت 7-6 روز حداقل برای گرفتن جواب زمان لازم است و به دلیل حساسیت این باکتری احتمال از بین رفتن آن در مراحل آزمایش و همچنین عدم تشخیص آن و نتیجه گیری نادرست، بسیار زیاد است اما روش PCR نوعی انگشت نگاری میکروبی است که حتی در صورت وجود یک میکروب نیز قادر به تشخیص DNA آن بوده و قادر به اثبات نتیجه درست آن در زمان بسیار کوتاه تر می‌باشد (2و8). همچنین در روش کشت میکروبی، تمایز گونه‌های این باکتری بر اساس آزمایش هیدرولیز هیپورات می‌باشد و همیشه تفکیک فنوتیپی جواب درستی نمی دهد (8 و19).

در مطالعه‌ی حاضر، نتیجه‌ی به کار بردن پرایمر اختصاصی دو گونه‌ی اصلی و مهم کمپیلوباکتر مولد اسهال نشان داد که میزان شیوع این باکتری در فصل‌های مختلف سال متفاوت می‌باشد. پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه، توسط خانزادی و همکاران (8)، Cloako و Fratamico (20) و Nayak و همکاران (21) نیز مورد استفاده قرار گرفته اند. در مطالعه حاضر دمای annealing، 42 درجه‌ی سانتی گراد می‌باشد در حالی که در چندین مطالعه‌ی مشابه، این دما متفاوت و 45 و56 درجه‌ی سانتی گراد بودند (21 و22). خانزادی و همکاران در شهر مشهد (8)، مطالعه‌ی

Archive of SID

www.SID.ir

مشابهی با مطالعه‌ی حاضر انجام داده اند که در آن میزان شیوع کمپیلو باکتر و تنها گونه *ججونای* در فصل تابستان مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه، 200 نمونه شیر خام مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاصل، نشان داده است که میزان شیوع جنس کمپیلوباکتر 15/5 درصد و میزان شیوع گونه *کمپیلوباکتر ججونای* 8 درصد بود.

در این مطالعه، سعی شده است تا علاوه بر بررسی میزان فراوانی این باکتری در داخل شیر، نقش فصل نیز بررسی شود و همان طور که در نتایج نشان داده شده است، بیش ترین میزان فراوانی این باکتری در فصل تابستان و کم ترین میزان در فصل زمستان بود. البته قابل ذکر است که مطالعات مشابهی که بر روی نمونه‌های گوشت و موارد اسهال در انسان صورت گرفته اند نیز عمدتاً در طی یک سال انجام گرفته اند و در اکثر این مطالعات، فصل به عنوان یک فاکتور مهم در شیوع این باکتری و ایجاد مسمومیت‌های غذایی ناشی از آن گزارش شده اند و نشان داده شده است که شیوع بیماری کمپیلوباکتریوزیس در تابستان بیش تر از فصل‌های دیگر است (2و9) . گفتنی است که با وجود بالا بودن نقش کمپیلوباکتر در ایجاد اسهال در قسمت‌های مختلف جهان، گزارش‌های کمی در مورد نقش این باکتری در ایجاد مسمومیت های غذایی مشاهده می‌شود که‌یکی از دلایل آن می‌تواند بهداشت غذا بخصوص بهداشت آب و شیر باشد که می‌تواند در کاهش میزان شیوع این باکتری بسیار موثر باشند (1، 2 و4).

4- سپاس گزاری

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر شفایی (رییس آزمایشگاه تشخیص پزشکی مرکزی آمل) که در تسهیل انجام کار کمک شایانی کردند.

5- منابع

1- کریم گ. 1388. بهداشت و فن آوری شیر، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، شماره‌ی 2880، صفحه‌ی 51.

2- ضیائی ن.، مظفری ن.، کوهسار ه.، مرادی ع.، تبرائی ع.، دادگر ت.، لیوانی ص. و عرب احمدی م. 1387. توزیع فراوانی *کمپیلوباکتر ژژونی* در نمونه‌های اسهالی شهر گرگان، *مجله‌ی علوم آزمایشگاهی*، شماره‌ی2، 42-36.

3-Center for Disease Control and Prevention. 2002. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses selected sites, United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 51: 325–329.

4- Jay, J.M. 1996. *Modern Food Microbiology*, International Thomson Publishing, pp. 556-559.

5-Adedayo, O. and Kirkpatrick, B. 2008. Campylobacter jejuni Infections: Update on presentation, Diagnosis, and Management. *Hospital Physician*, 44(7): 9-15.

6-Dingle, K.E., Van Den Braak, N., Colles, F.M., Price, L.J., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., Endtz, H.P, Van Belkum, A. and Maiden, M.C.J. 2001. Sequence typing confirms that Campylobacter jejuni strains associated with Guillain-Barre and Miller-Fisher syndromes are diverse genetic lineage, serotype and flagella type, *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3346-3349.

7-Beurner, R.R., Cruysen, J.J.M. and Birtanatie, I. 1988. The occurrence of Campylobacter jejuni in raw cow's milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(2): 93-96.

8-Khanzadi, S., Jamshidi, A., Soltaninejad V. and Khajenasiri S. 2010. Isolation and Identification of Campylobacter jejuni from Bulk Tank Milk in Mashhad-Iran, *World Applied Science Journal*, 9(6): 638-643.

9-Jamshidi, A., Bassami, M.R. and 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: 132-136.

10-Mateo, E., Carcamo, J., Urquijo, M., Perales, I., Fernandez-Astorga, A. 2005. Evaluations of a PCR assay for the detection and identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in retail poultry products, *Research in Microbiology*, 156: 568-574.

11-Lund, M. and Madsen, M. 2006. Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of campylobacter spp. in chicken fecal samples, *Molecular and Cellular Probes*, 20: 92-99.

12-Rahimi, E., Alian, F. and Alian, F. 2011. Prevalence and characteristic of Campylobacter species isolated from raw duck and goose meat in Iran, *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 9: 171-175.

13-Finch, M.J. and Blake, P.A. 1985. Foodborne outbreaks of Campylobacteriosis in the United States experience, 1980-1982, *American Journal of Epidemiology*, 122(2): 262-268.

Archive of SID

www.SID.ir

14-Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P. and Blaser M.J. 1988. Experimental Campylobacter jejuni infection in humans, *Journal of Infectious Disease*, 157: 99-116.
15-Perelle, S., Josefsen, M., Hoorfar, J., Dilasser, F., Grout, J. and Fach, P. 2004. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic Campylobacter, *Molecular and Cellular Probes*, 18: 321-327.
16-Müller, W., BÖhland, C. and Methner, U. 2011. Detection and genotypic differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains from laying hens by multiplex PCR and fla-typing, *Research in Veterinary Science*, 91: e48-e52.
17-Houng, H., Sethabutr, O., Nirdnoy, W., Katz, D. and Pang, L. 2001. Development of a ceuE-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Thailand, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 40: 11-19.
18-Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R. A., Greenway, D. L. A. and Borrow, R. 2001. Development of a PCR ELISA assay for the identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli, *Molecular and Cellular Probes*, 15: 291-300.
19-Nicholson, M.A., and Patton, C.M. 1993. Application of Lior biotyping by use of genetically identified Campylobacter strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 3348-3350.
20-Cloak, O.M. and Fratamico, P.M. 2002. A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles, *Journal of Food Protection*, 65: 266-273.
21-Nayak, R., Stewart, T.M. and 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.
22-Konkel, M.E., Gray, S.A., Kim, B.J., Garvis, S.G. and Yoon, J. 1999. Identification of the enteropathogens Campylobacter jejuni and Campylobacter coli based on the cadF virulence gene and its product, *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 510-517.

Archive of SID

www.SID.ir