

شناسایی گونه‌های کمپیلوباکتر در مدفوع سگ‌ها و گربه‌های به ظاهر سالم با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس چندگانه (M-PCR)

محمدرضا محزونیه^{۱*}، مهوش قربانی^۲، تقی زهرایی صالحی^۳

چکیده

کمپیلوباکتریوزیس بیماری مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شود و در بعضی موارد حیوانات حامل باکتری، منشأ عفونت برای انسان، می‌باشند. سگ و گربه‌های آلوده ممکن است بدون علامت بالینی بوده ولی باکتری را از خود دفع نمایند و گاهی هم علامت بالینی (نظیر اسهال) در آن‌ها دیده می‌شود. به همین دلیل تشخیص سریع و دقیق حیوانات آلوده اهمیت دارد. هدف این تحقیق تعیین میزان آلودگی به کمپیلوباکتر بوسیله آزمایش مولتیپلکس PCR در نمونه مدفوع سگ و گربه‌های ارجاعی به بیمارستان‌های دام کوچک شهر تهران بوده است. در این مطالعه، ۱۰۰ نمونه مدفوع سگ و گربه اهلی در شهر تهران بررسی شد. پرایمرهای مورد استفاده برای جستجوی توالی‌های اختصاصی در ژن‌های *16S rRNA*، *gly A*، *mapA* و *lpxA* کمپیلوباکتر انتخاب شدند. ابتدا با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال مواردی که حاوی توالی نوکلئوتیدی خاص جنس کمپیلوباکتر بود، شناسایی و سپس با روش مولتی پلکس PCR تعیین هویت گونه‌ها انجام شد. در مجموع تعداد ۳۹ نمونه به عنوان آلوده به کمپیلوباکتر شناخته شدند که از این ۳۹ نمونه، ۲ نمونه متعلق به گونه کمپیلوباکتر ژژونی و ۱۱ نمونه کمپیلوباکتر آپسالانسینس بود. تحلیل آماری نشان داد که ابتلا به کمپیلوباکتر آپسالانسینس در گربه نسبت به سگ بیشتر است ($p \leq 0.05$). نتایج بررسی نشان داد که می‌توان از روش PCR به عنوان روش تشخیصی سریع برای شناسایی باکتری‌های جنس کمپیلوباکتر و گونه‌های متعلق به آن در نمونه مدفوع حیوانات بیمار یا حامل استفاده کرد.

واژگان کلیدی: کمپیلوباکتر ژژونی، کمپیلوباکتر آپسالانسینس، مولتیپلکس PCR

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۶

مقدمه

کمپیلوباکترها باسیل‌های گرم منفی، متحرک، بدون اسپور، غیر تخمیر کننده اکسیداز مثبت هستند. این جنس دارای ۱۸ گونه بوده و دوز عفونی آن برای حیوانات و انسان پایین می‌باشد (۲ و ۱). رایج‌ترین گونه‌های کمپیلوباکتر در منابع دامی و غذایی کمپیلوباکتر ژژونی (*Campylobacter jejuni*)، کمپیلوباکتر

کولی (*C. coli*)، کمپیلوباکتر لاری (*C. lari*) و کمپیلوباکتر

آپسالانسینس (*C. upsaliensis*) است.

کمپیلوباکتر ژژونی و کمپیلوباکتر کولی شایع‌ترین گونه‌ها در ایجاد گاستروانتریت در انسان می‌باشند (۳). گاستروانتریت از جمله بیماری‌هایی است که در تمام دنیا شایع بوده و یکی از معضلات بهداشتی اکثر جوامع می‌باشد و همه ساله موجب زیان‌های جبران‌ناپذیر اقتصادی و تلفات انسانی می‌گردد. در هر سال حدود ۲ میلیون موارد منتهی به مرگ به علت ابتلا به اسهال اتفاق می‌افتد که سالمونلا، شیگلا و کمپیلوباکتر سه عامل شایع اسهال‌های باکتریایی در سراسر جهان هستند و طبق آمارهای جهانی ۲ تا ۳۵٪ این‌گونه اسهال‌ها ناشی از کمپیلوباکتر می‌باشد. از جمله افراد در معرض خطر، کودکان، افراد سالخورده و افرادی هستند که سیستم ایمنی ضعیفی دارند (۴). علاوه بر گاستروانتریت، کمپیلوباکتریوزیس در افرادی که دارای HLA B-27 هستند، احتمالاً منجر به بروز سندرم گیلن باره می‌شود که از عوارض مهم و دیررس عفونت کمپیلوباکتر می‌باشد (۵). این باکتری را می‌توان غالباً از محصولات ماکیان، مدفوع خوک، دستگاه تناسلی و دستگاه گوارشی گاو، شیر خام، مدفوع مبتلایان به آنتریت، خون، دستگاه گوارش و تناسلی، مایع مغزی نخاعی، انواع آبسه‌ها و عفونت‌های لته، جفت و جنین‌های سقط شده و اسپرم جدا کرد (۱۸). انتقال این باکتری از راه‌های مختلف به انسان مانند آلوده شدن دست در اثر تماس با مدفوع حیوانات خانگی، خوردن گوشت و محصولات لبنی آلوده و مصرف آب آلوده و تماس‌های شغلی صورت می‌گیرد.

*- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد و پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام، شهرکرد، ایران. (mahzounieh@vet.sku.ac.ir)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

در این بررسی ۱۰۰ نمونه مدفوع (۵۰ قلاده سگ و ۵۰ قلاده گربه بدون علائم بالینی) در ظرف مخصوص نمونه‌گیری، جمع‌آوری و برای استخراج DNA بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شد. مقدار ۲۰۰ میلی گرم از نمونه‌های مدفوع وزن شده و با استفاده از کیت استخراج و تخلیص DNA (تهیه شده از شرکت Bioneer) ژنوم باکتری تخلیص و جدا گردید. محلول داخل لوله که حاوی DNA بود در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام PCR نگهداری شد. برای حصول اطمینان از صحت انجام تخلیص ژنوم، نمونه‌های حاصل با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام مولتیپلکس PCR از چهار زوج پرایمر اختصاصی (جدول ۱)، استفاده شد که توالی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است.

تماس با حیوانات خانگی از جمله سگ‌های اهلی یکی از راه‌های انتقال این میکروارگانیسم است. اهمیت این نوع انتقال زمانی زیاد می‌شود که سگ‌های بدون علائم بالینی، حامل این باکتری باشند (۱۱). با توجه به اهمیت موضوع از نظر اقتصادی و بهداشتی و سلامت جوامع انسانی، تشخیص سریع و دقیق این میکروارگانیسم از حاملان این باکتری (از جمله سگ و گربه) ضروری می‌باشد. در این تحقیق برای رسیدن به این هدف از روش مولتی پلکس PCR برای شناسایی حیوانات سالم و حامل گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر استفاده شد.

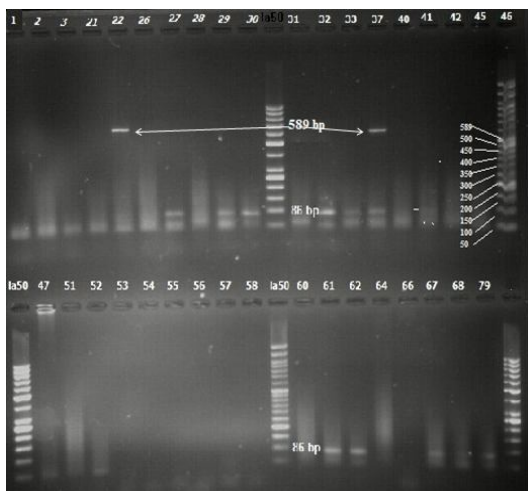
مواد و روش کار

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (۶،۱۹).

Species and gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size(bp)
Campylobacter(16S rRNA)	AATCTAATGGCTTAACCATTA	GTAAGTAGTTTAGTATTCCGG	۸۱۶
<i>C. clari</i> (<i>glyA</i>)	TAGAGAGATAGCAAAAAGAGA	TACACATAATAATCCCACCC	۲۵۱
<i>C. upsaliensis</i> (<i>lpxA</i>)	CGATGATGTGCAAATTGAAGC	TTCTAGCCCCCTTGCTTGATG	۸۶
<i>C. jejuni</i> (<i>mapA</i>)	CTATTTTATTTTGGAGTGCTTG TG	GCTTTATTGCCATTGTGTTTATTA	۵۸۹

واکنش PCR با استفاده از پرایمر 16S rRNA و در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری انجام گردید. واکنش مولتی پلکس PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱/۵ میکرولیتر ۵۰MgCl₂ میلی مولار، یک میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز، ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میلی مولار از هر کدام از پرایمرها (*glyA*، *mapA* و *lpxA*) و ۳ میکرولیتر DNA الگو) انجام شد. اجرای برنامه دمایی واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر Corbett ساخت استرالیا صورت پذیرفت. پس از الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪، با استفاده از دستگاه ژل داکيومنتیشن (UVitec, UK) (Gel Documentation) مشاهده شد. از مارکر DNA ۵۰ جفت باز (سیناژن، ایران) برای تعیین

پرایمر (16S rRNA) برای تشخیص اختصاصی جنس کمپیلوباکتر و سه جفت پرایمر دیگر برای توالی‌های اختصاصی گونه‌های کمپیلوباکتر لاری (ژن *glyA*)، کمپیلوباکتر ژرونی (ژن *mapA*) و کمپیلوباکتر آپسالینسیس (ژن *lpxA*) مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها جهت جستجوی کمپیلوباکتر به وسیله PCR با استفاده از پرایمرهای ثبت شده در جدول ۱ که قبلاً توسط Denis و Yamazaki در سال ۲۰۰۲ و ۲۰۰۷ به ثبت رسیده است، مورد آزمون قرار گرفت. سویه‌ی استاندارد کمپیلوباکتر ژرونی ATCC 29428 از مؤسسه رازی تهیه و با استفاده از جارب‌بی هوازی به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد انتقال یافت. DNA ژنومی سویه استاندارد به روش جوشاندن استخراج شد.



نگاره ۲- تصویر الکتروفورز تعدادی از محصولات مولتی پلکس PCR ژن *mapA* از کمپیلوباکتر ژژونی و ژن *lpxA* از کمپیلوباکتر آپسالانسیس که محصول PCR آنها به ترتیب ۵۸۹bp و ۸۶bp بود. چاهک شماره ۱ کنترل منفی می‌باشد.

جدول ۲- بررسی آماری ارتباط سن جنس و نژاد سگ و گربه با جنس کمپیلوباکتر و گونه‌های آن و همچنین مقایسه این گونه‌ها در سگ با گربه

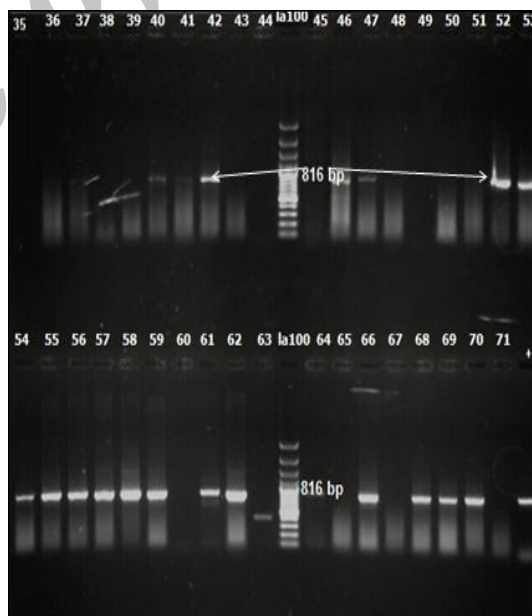
گونه حیوان	گونه‌ی باکتری	
	کمپیلوباکتر ژژونی	کمپیلوباکتر آپسالانسیس
گربه	سن	۰/۲۳۸
	جنس	۰/۶۲۳
	نژاد	۰/۳۹۸
سگ	سن	۰/۰۹۴
	جنس	۰/۶۹۷
	نژاد	۰/۲۴۰
سگ و گربه	۰/۱۵۱	۱

در جدول ۲ ارتباط آلودگی با جنس کمپیلوباکتر و دو گونه آن، با سن، نژاد و جنس سگ و گربه، به تفکیک با نرم افزار نسخه ۱۶ و به روش مربع کای نشان داده شده، همچنین در سگ و گربه نیز این آلودگی در مقایسه با هم بررسی شد که شیوع کمپیلوباکتر آپسالانسیس در دو گونه سگ و گربه نسبت به هم، اختلاف معنی داری، دارد ($P < 0.05$).

وزن محصولات PCR استفاده شد. بررسی آماری ارتباط بین شیوع کمپیلوباکتر با سن، جنس و نژاد سگ و گربه با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و نتایج $p \leq 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه آزمایش شده، ۳۹ نمونه مثبت (نگاره ۱)، از نظر آلودگی به جنس کمپیلوباکتر شناسایی شد که ۱۶ نمونه آن متعلق به سگ و ۲۳ نمونه مربوط به گربه بود. از این ۳۹ نمونه، ۲ نمونه از نظر کمپیلوباکتر ژژونی (یک سگ و یک گربه) و ۱۱ نمونه از نظر گونه کمپیلوباکتر آپسالانسیس (یک مورد در سگ و ده مورد تا گربه) مثبت بود (نگاره ۲). همچنین هیچ باند اختصاصی مربوط به کمپیلوباکتر لاری در نمونه‌های بررسی شده مشاهده نگردید.



نگاره ۱- تصویر الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR ژن *rRNA* ۱۶s اختصاصی جنس کمپیلوباکتر. اندازه قطعه تکثیر شده مورد نظر ۸۱۶ bp می‌باشد. چاهک شماره ۷۲ به عنوان کنترل مثبت (با استفاده از سویه استاندارد ATCC 29428) و چاهک شماره ۷۱ کنترل منفی است. شماره‌های روی چاهک‌ها مربوط به شماره نمونه‌ها می‌باشد.

بحث

کمپیلوباکتر یکی از عوامل اصلی ایجاد کمپیلوباکتریوزیس در انسان می‌باشد. در اتحادیه اروپا کمپیلوباکتریوزیس به عنوان شایع‌ترین بیماری مشترک بین انسان و دام معرفی شده است. مهمترین گونه‌های بیماری‌زای کمپیلو باکتر در انسان شامل: کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی می‌باشند. شیوع گونه‌های کمپیلوباکتر با منشأ حیوانی در بسیاری از کشورها ثبت شده است، اما اطلاعات اندکی از کشورهای در حال توسعه موجود است (۱۶). روش‌های مولکولی برای تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر طی سال‌های اخیر توسعه یافته و هم اکنون از نظر تجاری قابل دسترسی بوده و مورد استفاده قرار می‌گیرند. به طور معمول در حال حاضر شناسایی کمپیلوباکتر در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی انسانی بر پایه کشت، جداسازی و تست‌های تشخیصی خواص فنوتیپی است (۱۷ و ۱۲). از آنجایی که کمپیلوباکتر جزو باکتری‌های سخت رشد بوده و جداسازی آن از نمونه‌های شدیداً آلوده مثل مدفوع که دارای تعداد بیشتر باکتری‌های سریع‌الرشد است، مشکل می‌باشد، لذا روش‌های مولکولی بر پایه PCR می‌توانند در شناسایی کمپیلوباکتر جانشین روش‌های کشت از نمونه‌های بالینی شوند (۱۳). Denis و همکاران، در کشور فرانسه در سال ۱۹۹۹، برای شناسایی کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کولی از دو روش PCR و روش‌های مرسوم استفاده کردند. آنها نشان دادند که میزان حساسیت روش PCR به مراتب بیشتر از روش معمولی می‌باشد (۷). در مطالعه Chaban و همکاران، موارد آلودگی به کمپیلوباکتر در نمونه‌های مدفوع سگ‌های سالم و اسهالی به ترتیب ۸۵٪ و ۹۷٪ گزارش شد (۶) که این میزان در مقایسه با نتایج حاصله از بررسی ما بیشتر می‌باشد. در مطالعه دیگری که در آمریکا انجام گرفت از ۲۹۱ سگ با علائم گاستروانتریت، ۲۱۸ سگ (۷۵٪) به کمپیلوباکتر آلوده بودند که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. Linton و همکاران در کشور آمریکا

در سال ۱۹۹۷، ۲۵ نمونه اسهالی سگ را به روش PCR مورد بررسی قرار دادند که ۲۰ مورد از نمونه‌ها حاوی توالی اختصاصی کمپیلوباکتر بود که از این تعداد ۱۷ نمونه از نظر کمپیلوباکتر ژرونی، ۲ نمونه از نظر کمپیلوباکتر کولی و ۱ نمونه از نظر کمپیلوباکتر هیو ایتستینالیس مثبت بودند (۱۴). در این تحقیق از ۱۰۰ نمونه مدفوع سگ سالم، ۳۹ مورد به کمپیلوباکتر آلوده بودند که این میزان در بین سگ‌های سالم درصد بالایی می‌باشد. Moser و همکاران گزارش کرده‌اند که میزان آلودگی سگ‌های جوان نسبت به سگ‌های بالغ بیشتر است (۱۵) ولی در این تحقیق هیچ رابطه معنی‌داری بین شیوع کمپیلوباکتر با سن، نژاد و جنسیت سگ وجود نداشت. در کشور پرو طی یک بررسی، میزان آلودگی به کمپیلوباکتر در بین طوطی‌ها ۸٪ نشان داده شد (۱۳). در بررسی پرندگان وحشی انگلستان شمالی، آمریکا و نیوزلند میزان آلودگی به کمپیلوباکتر به ترتیب ۱/۴، ۷/۲ و ۱۲/۵٪ گزارش شد (۹ و ۸). این در حالی است که میزان موارد آلودگی به کمپیلوباکتر در بین سگ‌ها در بیشتر موارد بالای ۵۰٪ گزارش شده است. سگ و گربه به عنوان مخازن کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر آپسالانسیس هستند. مخزن کمپیلوباکتر لاری معمولاً پرندگان می‌باشد اما از سگ و گربه‌هایی که با پرندگان نگهداری می‌شوند نیز جدا شده‌اند (۱۸). در ارتباط با آلودگی مواد غذایی به کمپیلوباکتر کارهای زیادی در ایران انجام شده، از جمله جمشیدی و همکاران یکصد لاشه طیور را به دو روش m-PCR و روش‌های مرسوم مورد بررسی قرار دادند و میزان آلودگی را به روش‌های مرسوم، ۷۸٪ و به روش m-PCR، ۲۸٪ گزارش کردند (۱۰). گوشت مرغ یکی از مواد غذایی مورد استفاده سگ و گربه می‌باشد. در کل می‌توان گفت سگ‌ها نسبت به سایر حیوانات از جمله پرندگان، در انتقال کمپیلوباکتر به انسان از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند. سگ‌های خانگی به طور معمول ارتباط نزدیکی با افراد خانه خصوصاً

- نظر عفونت با کمپیلوباکتر ژرونی، مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره ۱۹، شماره ۳: ۳۱۵-۲۱۲.
۳. فروهش تهرانی، ه. (۱۳۸۲): گزارش یک مورد مننژیت ناشی از کمپیلوباکتر فتوس در بزرگسالان، مجله علوم پزشکی ایران، دوره ۳۶، شماره ۱۰: ۵۷۹-۵۸۳.
۴. فیض آبادی م، دولت آبادی س.، سلمانزاده، س.، معزاردلان، س.، جباراللهی، ع.، زالی، م. (۱۳۸۴): بررسی میزان شیوع عفونت‌های کمپیلوباکتریایی در کودکان مبتلا به اسهال در دو بیمارستان تهران و تعیین مقاومت دارویی سویه‌های جدا شده، مجله پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دوره ۲۹، شماره ۳: ۲۲۴-۲۱۹.
۵. مهدی زاده، م.، اسکندری، س. (۱۳۸۸): نقش کمپیلوباکتر ژرونی در بروز کمپیلوباکتریوز، مجله علوم پزشکی کرمان، دوره ۲، شماره ۳۱: ۱۹۶-۱۸۸.
6. Chaban, B., Ngeleka, M., Hill, J.E. (2010): Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiology*. 10: 73.
7. Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Erme, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P. (2002): Development of am-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* 29: 406-410.
8. French, N.P., Midwinter, A., Holland, B., Collins-Emerson, J., Pattison, R. (2009): Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from Wild-Bird fecal material in children's playgrounds. *Appl Environ Microbiol* 75: 779-83.
9. Hughes, L.A., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, J., Jones, T.R. (2009): Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Appl Environ Microbiol* 75: 3007-15.
10. 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

بچه‌ها دارند. آلوده بودن ۳۲٪ از سگ‌های سالم به کمپیلوباکتر، نشان می‌دهد که سگ‌های سالم هم می‌توانند به عنوان یک حامل کمپیلوباکتر برای انسان تهدیدکننده باشند. آنجا که این مطالعه روی سگ‌های سالم انجام شده است، میزان موارد آلودگی به کمپیلوباکتر در این تحقیق، نسبت به مطالعاتی که روی سگ‌های مبتلا به اسهال انجام شده بود کم می‌باشد. با وجود این، جدا شدن کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر آپسالانسینیس از این سگ‌ها نشان می‌دهد که باید به نقش سگ‌های سالم نیز در انتقال کمپیلوباکتر از طریق مدفوع توجه گردد. در این مطالعه همچنین نشان داده شد که آزمون PCR برای تشخیص سریع حیوانات ناقل می‌تواند از لحاظ اقتصادی و صرفه‌جویی در وقت بهترین عملکرد را داشته باشد. گربه‌ها بیشترین میزان آلودگی به گونه‌ی آپسالانسینیس را داشتند. افرادی که سگ و گربه نگهداری می‌کنند باید توجه داشته باشند، همانطوری که افراد یک خانواده ملزم به رعایت یکسری اصول بهداشتی هستند، در ارتباط با سگ و گربه نیز رعایت اصول بهداشتی، از جمله عدم تماس با مدفوع حیوان، الزامی است. اگرچه کمپیلوباکتر آپسالانسینیس فلور نرمال روده سگ و گربه هست و رعایت اصول بهداشتی در این زمینه کفایت می‌کند ولی کمپیلوباکتر ژرونی عامل کمپیلوباکتریوز از جمله بیماری‌های ژونوز می‌باشد.

فهرست منابع

۱. تاجبخش، ح.، احمدی، م.، فخرزادگان، ف.، نادعلیان، م.ق. (۱۳۷۹): بررسی عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر فتوس زیرگونه فتوس در گوسفنداری‌های اطراف تهران و اصفهان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۳: ۹۹-۹۱.
۲. رحیمی، م.، علمبگی، پ.، موسوی، ل.، عدیمی، پ.، طیبی، ز.، معصومی، م. (۱۳۸۸): بررسی مبتلایان به اسهال خونی از

- Research 9: 132-136.
11. Kim, S., Lee, Y.M., Hwang, I.G., Kang, D.H., Woo, G.J., Rhee, M.S. (2009): Eight enrichment broths for the isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated suspensions and ground pork. *Lett Appl Microbiol* 49: 620-626.
 12. Klena, J.D., Parker, C.T., Knibb, K., Ibbitt, J.C., Devane, P.M., Horn, S.T., Miller, W.G., Konkel, M.E. (2004): Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol* 42: 5549-5557.
 13. Lastovica, A.J., Le Roux, E. (2001): Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stool. *J Clin Microbiol* 39: 4222-4223.
 14. Linton, D., Lawson, A., Owen, R., Stanley, J. (1997): PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 35: 2568-2572.
 15. Moser, I., Riexneuwöhner, B., Lentzsch, P. (2001): Genomic Heterogeneity and O-Antigenic Diversity of *Campylobacter upsaliensis* and *Campylobacter helveticus* Strains Isolated from Dogs and Cats in Germany. *J Clin Microbiol* 39: 2548-2557.
 16. Rees, J.H., Soudain, S.E., Gregson, N.A., Richard, A.C., Hughes, M.D. (1995): *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med* 333: 1374-1379.
 17. Rosyidi, A., Budhiharta, S., Asmara, W., Yudhabuntara, D. (2011): Phenotypic and Genotypic Detection of *Campylobacter jejuni* at Local Chicken and Chicken Meat. *Animal Production* 12: 128-134.
 18. Vandenberg, O., Skirrow, M.B., Butzler, J.P. (2005): *Campylobacter* and *Arcobacter*. Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections* 2: 1541-1553.
 19. Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., Tsukamoto, T. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 1467-1473.