

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

عباس توکلی واسکس^۱، گیتی کریم^۲، مهدی شریفی سلطانی^۳، داود نصیری^۴، هادی پورجعفر^{۵*}

^۱ مدرس گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت الله آملی، آمل، ایران

^۲ استاد دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ عضو هیات علمی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، چالوس، ایران

^۴ عضو هیات علمی دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نقده، نقده، ایران

^۵ دانشجوی دوره‌ی Ph.D بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۵/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۲۵

چکیده

در این مطالعه، تعداد ۱۳۸ نمونه شیر از مراکز جمع آوری شیر شهرستان آمل در هر فصل سال (۱۳۸۹) و به روش تصادفی ساده، تهیه شدند. نمونه‌ها در شرایط سرما به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت آبگوشت غنی کننده کمپیلوباکتر تحت شرایط میکروآنروفلیک در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت زمان ۴۸ 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 ججوناوی و کولای صورت پذیرفت. DNA ladder 100 pb به عنوان یک Reference Size برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR برای گونه‌ی ججوناوی ۱۶۰ pb و برای گونه‌ی کولای ۸۹۴ bp با ژل الکتروفورز شناسایی شد. از مجموع ۱۳۸ نمونه در هر فصل در فصل بهار، ک. ججوناوی ۶/۶ درصد و ک. کولای ۱/۵ درصد، در فصل تابستان، ک. ججوناوی ۱۱/۶ درصد و ک. کولای ۳/۷ درصد، در فصل پاییز، ک. ججوناوی ۵/۱ درصد و ک. کولای ۲/۲ درصد، در فصل زمستان ک. ججوناوی ۲/۹ درصد و ک. کولای ۰/۸ درصد تشخیص داده شدند. نتایج این مطالعه، نشان داد که در فصل تابستان، کمپیلوباکتر ججوناوی و کولای در بیشترین میزان شیوع و در فصل زمستان در کمترین میزان شیوع در شیرهای خام شهرستان آمل بودند ($p < 0.05$).

واژه‌های کلیدی: کمپیلوباکتر ججوناوی، کمپیلوباکتر کولای، شیوع فصلی، PCR، آمل.

۱- 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 مورد عفونت از این باکتری در هر سال گزارش می‌شود (۱، ۲، ۳ و ۴). کمپیلوباکتریوزیس به عنوان یک بیماری مهم مشترک، سهم عمده‌ای در ایجاد گاستروانتریت‌های عفونی انسان دارد و در بسیاری از کشورهای دنیا اولین عامل گاستروانتریت محسوب شده و علاوه بر ایجاد اسهال آبکی و خونی، باعث بیماری‌های ثانویه‌ای مثل مننژیت، کوله سیستیت و سندرم Guillain Barre هم می‌گردد (۴، ۵ و ۶). این باکتری که در قرن نوزدهم توسط Theodor Escherich شناسایی شد، گرم منفی، فنری شکل یا خمیده می‌باشد و در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط میکروآتروفیلیک به خوبی رشد می‌کند و در دمای زیر ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد آن متوقف می‌شود ولی از بین نمی‌رود (۲ و ۴). 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 (۲ و ۴). مطالعات، نشان می‌دهد که این باکتری به طور عمده همراه با مواد غذایی با منشأ دامی است (۱). شیر خام، شایع‌ترین علت بیماری‌های روده‌ای در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به کمپیلوباکتر بوده است که عمدتاً با مدفوع گاو و یا از طریق ورم پستان، آلوده می‌گردد (۱). همچنین، گوشت قرمز و طیور، آب‌های سطحی تصفیه نشده و قارچ‌های خوراکی هم از عوامل عفونت غذایی کمپیلوباکتریوزیس می‌باشند و عمدتاً بیماری در فصل‌های بهار و تابستان شایع می‌باشد (۴).

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 و جوی ما، مطالعات کمی در مورد بررسی فراوانی این باکتری در داخل شیر با روش PCR موجود می‌باشد (۷ و ۸) و مطالعات عمدتاً در مورد بررسی فراوانی این باکتری در گوشت قرمز و طیور و هم‌چنین در نمونه‌های اسهالی می‌باشند (۲، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲).

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 عفونت‌ها 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 فرآورده‌های خام حاصل از آن جلوگیری کرده و در نتیجه به ارتقا بهداشت همگانی کمک نمود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع فصلی کمپیلوباکتر ججونا‌ی و کمپیلوباکتر کولای در شیرهای خام شهرستان آمل با استفاده از روش PCR می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه باکتری مورد استفاده

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

۲-۲- جمع آوری نمونه‌های شیر خام

در هر فصل ۱۳۸ نمونه شیر به روش نمونه‌گیری تصادفی ساده از چهار سکوی جمع آوری شیر (این چهار سکو عمده شیر شهرستان آمل را تامین می‌کنند) جمع آوری شدند. نمونه‌ها در شرایط سرما به آزمایشگاه منتقل شد.

ترکیب $10 \times dNTP$ ، $0.7 \mu l$ از هر پرایمر (پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است)، $0.2 \mu l$ Taq polymerase ($5 U / \mu l$) و آب غیر یونیزه بود و حجم نهائی در حدود $25 \mu l$ شد (۸).

جدول ۱- پرایمرهای PCR استفاده شده برای تشخیص

کمپیلوباکتر ججوناوی 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 نهایتاً PCR طبق شرایط زیر انجام گرفت: دنا تورا سیون حرارتی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۳ چرخه با دنا تورا سیون دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، annealing در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ extension و ۷۲ final extension درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. محلول PCR به وسیله الکتروفورز در ۱/۵ درصد ژل آگار و شرایط ۷۱۰۰ به مدت ۴۰ دقیقه در بافر تریس- استات جدا سازی شده و به وسیله رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده گردید. سپس، به وسیله UV- transilluminator خوانده شده و به وسیله gel documentation apparatus مستند شد (۸). DNA ladder 100 pb به عنوان یک Size reference برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت (۸). ژنومیک DNA استخراج شده از کمپیلوباکتر ججوناوی و کولای به عنوان کنترل مثبت در همه مراحل PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

۳-۲- غنی سازی نمونه های شیر

در آزمایشگاه ۱۰ ml شیر خام در شرایط 14000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۵ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و سپس توده به دست آمده به ۴۵ ml محیط آنگوشت غنی کنندهی کمپیلوباکتر انتقال یافت و در شرایط اتمسفر میکرو آتروفیلیک (۵ درصد اکسیژن، ۱۰ درصد دی اکسید کربن و ۸۵ درصد نیتروژن) و دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. محیط آنگوشت غنی کننده شامل نوترینت برات (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، محیط های غنی شده به داخل یک محیط کشت انتخابی که بر پایهی blood agar بود انتقال یافت که حاوی ۷ درصد lysed horse blood و آنتی بیوتیک های 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 میکرو آتروفیلیک و در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۴۸ ساعت، گرمخانه گذاری شدند (۸).

۴-۲- استخراج DNA

در این مرحله، کلونی های یکسان موجود در پلیت های 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 ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس، نمونه ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه داخل یخ قرار داده شدند تا سریعاً سرد شوند. بعد، تحت شرایط 13000 rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. جهت انجام آزمایش PCR، مایع رویی حاصل از سانتریفوژ به عنوان الگوهای DNA مورد استفاده قرار گرفتند (۸).

۵-۲- آزمایش Multiplex PCR

ترکیب واکنشی شامل $2.5 \mu l$ لاشه لیز شدهی باکتری (bacterial lysate)، $2.5 \mu l$ بافر $10 \times BSA$ ، $2.4 \mu l$



شکل ۱ - کمپیلوباکتری ججونای در بخش 160bp و کمپیلوباکتر کولی در بخش 894bp و کمپیلوباکتر در بخش 400bp قابل مشاهده هستند.

روش نسبت به روش‌های کشت میکروبی، دقت بسیار بالا و سرعت زیاد آن در جواب گرفتن است به طوری که در روش کشت ۶-۷ 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 (۸ و ۲). همچنین در روش کشت میکروبی، تمایز گونه‌های این باکتری بر اساس آزمایش هیدرولیز هیپورات می‌باشد و همیشه تفکیک فنوتیپی جواب درستی نمی‌دهد (۸ و ۱۹).

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 (۸)، Cloako و Fratamico (۲۰) و Nayak و همکاران (۲۱) نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در مطالعه حاضر دمای annealing ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد در حالی که در چندین مطالعه‌ی مشابه، این دما متفاوت و ۴۵ و ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد بودند (۲۱ و ۲۲). خانزادی و همکاران در شهر مشهد (۸)، مطالعه‌ی مشابهی با مطالعه‌ی حاضر انجام داده‌اند که در آن میزان شیوع کمپیلوباکتر و تنها گونه ججونای در فصل تابستان مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه، ۲۰۰ نمونه

محصول PCR برای کمپیلوباکتر ۴۰۰bp، گونه‌ی ججونای ۱۶۰pb و برای گونه‌ی کولای ۸۹۴bp با ژل الکتروفورز شناسایی شد (شکل ۱).

۲-۶- آنالیز آماری

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

۳- نتایج و بحث

در این بررسی از مجموع ۱۳۸ نمونه در هر فصل، در فصل بهار، کک. ججونای ۶/۶ درصد و کک. کولای ۱/۵ درصد، در فصل تابستان، کک. ججونای ۱۱/۶ درصد و کک. کولای ۳/۷ درصد، در فصل پاییز، کک. ججونای ۵/۱ درصد و کک. کولای ۲/۲ درصد، در فصل زمستان کک. ججونای ۲/۹ درصد و کک. کولای ۰/۸ درصد تشخیص داده شدند. بر اساس این نتایج، بیشترین میزان شیوع کمپیلوباکتر ججونای و کمپیلوباکتر کولای در فصل تابستان و کمترین 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 (۱۳ و ۱۴). دوز عفونی این باکتری کم و حدود ۵۰۰ سلول باکتری می‌باشد (۱۴ و ۱۵). با روش PCR که دقت بسیار بالایی دارد می‌توان تقریباً از حضور یا عدم حضور انواع کمپیلوباکتر مطمئن شد (۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸). مزیت این

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.

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

شیر خام مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاصل، نشان داده است که میزان شیوع جنس کمپیلوباکتر ۱۵/۵ درصد و میزان شیوع گونه کمپیلوباکتر ججوناوی ۸ 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، بیشترین میزان فراوانی این باکتری در فصل تابستان و کمترین 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 (۹ و ۲). 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 مسمومیت‌های غذایی مشاهده می‌شود که یکی از دلایل آن می‌تواند بهداشت غذا بخصوص بهداشت آب و شیر باشد که می‌تواند در کاهش میزان شیوع این باکتری بسیار موثر باشند (۱، ۲ و ۴).

۴- سپاس‌گزاری

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

۵- منابع

۱- کریم‌گ. ۱۳۸۸. بهداشت و فن آوری شیر، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، شماره ۲۸۸۰، صفحه ۵۱.

۲- ضیائی ن، مظفری ن، کوهسار ه، مرادی ع، تبرائی ع، دادگر ت، لیوانی ص. و عرب احمدی م. ۱۳۸۷. توزیع فراوانی کمپیلوباکتر ژژرونی در نمونه‌های اسهالی شهر گرگان، *مجله‌ی علوم آزمایشگاهی*، شماره ۲، ۴۲-۳۶.

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.

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.