View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical sciences

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره پنجم، شماره ۳/ ۱۱-۴/ پائیز ۱۳۸۲

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

# شناسایی کامپیلوباکترهای بیماریزای روده ای در مدفوع مرغ ها با روش PCR و مقایسه آن با روش کشت

دکتر محمد بکائیان*، دکتر رسول صالحی**، دکتر شهرام شهرکی زاهدانی***، مظهر اقبال قریشی◊

## چکیده:

**امروزه کامپیلوباکترها از شایع ترین علل اسهال های باکتریایی در سرتاسر جهان محسوب می شوند. در جنس کامپیلوباکتر ۱۸ گونه و تحت گونه وجود دارد که گونه های Campylobacter jejuni و Campylobacter coli مسبب اکثر عفونت های انسانی ناشی از کامپیلوباکترها می باشند و مهم ترین بیماری آنها نیز اسهال می باشد. بیماری در انسان متعاقب مصرف آب و مواد غذایی بویژه گوشت ماکیان رخ می دهد. تشخیص باکتریولوژیک این باکتری با دشواری زیادی از قبیل طولانی بودن مدت انکوباسیون و محدودیت تست های افتراقی همراه است. بنابراین استفاده از روش های دیگر تشخیصی امروزه مورد توجه قرار گرفته است. تعداد ۱۱۶ نمونه رکتال سواپ از مرغ های موجود در مرغداری های شهر اصفهان گرفته شده و پس از ۱۸-۱۲ ساعت غنی سازی در محیط Campy-Thio، در محیط اختصاصی Campylobacter selective agar کشت شدند. برای شناسایی و تعیین گونه ها از رنگ آمیزی گرم و تست های اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز هیپورات و سنجش حساسیت به نالیدیسیک اسید و سفالوتین استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیت های اختصاصی استفاده شد و با استفاده از پرایمرهای ویژه گونه های ژژونی و کلی اقدام به انجام PCR (Palymeras Chain Reaction) گردید. نتیجه کشت در ۱۱ مورد مثبت بود (۹/۵٪) که از این تعداد ۸ مورد مربوط به گونه ژژونی و ۳ مورد مربوط به گونه کلی بود. نتیجه PCR نمونه ها در ۲۷ مورد مثبت بود (۲۳/۲٪) که از این تعداد ۱۸ مورد مربوط به گونه ژژونی و ۹ مورد مربوط به گونه کلی بود. حساسیت و ویژگی روش PCR در مقایسه با روش کشت بترتیب ۱۰۰ و ۸۴/۷ درصد بود. روش PCR مورد استفاده در این تحقیق قادر به شناسایی تمام نمونه های کشت مثبت بود و نتایج تعیین گونه با این روش تطابق کاملی با روش بیوشیمیایی داشت. بنابراین با توجه به دقت بالا و سرعت زیاد به نظر می رسد روش PCR جایگزین مناسبی جهت کشت در تشخیص کامپیلوباکترها در نمونه های مرغ ها باشد.**

***واژه های کلیدی:*** کامپیلوباکتر ژژونی، کامپیلوباکتر کلی، واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)، کشت، ماکیان.

## مقدمه:

کامپیلوباکترها ارگانیزم هایی هستند میله ای شکل، غیر اسپورزا، متحرک، گرم منفی و خمیده که به خانواده کامپیلوباکتریاسه تعلق دارند. در این خانواده ۱۸ گونه و تحت گونه شناخته شده وجود دارد که در این بین گونه های jejuni و coli مسئول غالب موارد عفونت های کامپیلوباکتری در انسان محسوب می شوند (۹).

امروزه کامپیلوباکترها از شایع ترین علل اسهال های باکتریایی در سرتاسر جهان محسوب شده و

*استادیار گروه میکروب شناسی - دانشگاه علوم پزشکی: زاهدان - میدان مشاهیر - دانشکده پیراپزشکی - گروه میکروب شناسی - تلفن: ۰۵۴۱ - ۲۴۱۵۰۸۱، (مؤلف مسئول).
**استادیار علوم بیولوژی سلولی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.
***استادیار گروه میکروب شناسی - دانشگاه علوم پزشکی زاهدان.
◊ مربی گروه میکرب شناسی - دانشگاه علوم پزشکی زاهدان.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

بر طیق آمارهای جهانی ۲ تا ۳۵ درصد این گونه اسهال ها ناشی از این باکتری ها می باشد (۹).

بیماری در انسان در پی مصرف شیر، آب و غذای آلوده رخ می دهد و در پاره ای گزارشات ۵۰ تا ۷۰ درصد عفونت های اسپورادیک کامپیلوباکتری را ناشی از مصرف گوشت ماکیان دانسته اند (۱). در برخی بررسی های مربوط به جداسازی کامپیلوباکترها از مدفوع مرغ ها، ۳۰ تا ۱۰۰ درصد آنها حامل کامپیلوباکتر به صورت فلور نرمال دستگاه گوارش گزارش شده است (٤). این در حالی است که در برخی بررسی ها درصد ناچیزی از مرغ ها حامل این باکتری ها گزارش شده است (٤).

امروزه تشخیص این باکتری ها توسط کشت در محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک صورت می گیرد و شناسایی تأییدی گونه ها توسط تعداد معدودی تست های بیوشیمیایی از جمله هیدرولیز هیپورات صورت می گیرد (۱۳). آمار مربوط به درصد جداسازی گونه های ژژونی و کلی از مدفوع ماکیان به روش بیوشیمیایی اختلاف زیادی را نشان می دهد (۵،٦،۱٤،۱۷). به عنوان مثال در بررسی Ng و همکاران ۹۹ درصد کامپیلوباکترهای جدا شده از ماکیان متعلق به گونهٔ ژژونی و ۱ درصد بقیه متعلق به گونه کلی گزارش گردیده (۱٤) در حالی که در بررسی Van Looveren و همکاران این نسبت به ترتیب ۷۹ و ۲۱ درصد (۱۷) و در بررسیEyigor و همکاران این نسبت به ترتیب ٦۷ و ۳۳ درصد (۵) گزارش گردیده است. وجود اشکالات مختلف در این زمینه از قبیل مدت انکوباسیون طولانی (۷۲-٤۸ ساعت)، عدم قطعیت نتایج تست های بیوشیمیایی و وجود سویه های تیپیک زنده ولی غیر قابل رشد در محیط کشت موجب شده تا روش های دیگر تشخیصی مورد توجه قرار گیرند. یکی از مهم ترین این روش ها روش مولکولی PCR می باشد (٤،۱۱). آمار مربوط به جداسازی کامپیلوباکترها از مرغ ها به روش PCR متفاوت می باشد (۲،۵،۸،۱۹). به عنوان مثال در بررسی Eyigor و همکاران و Grennan و همکاران، ۱۰۰ درصد نمونه های ماکیان از نظر PCR مثبت گزارش گردیده اند (۵،۸). در حالی که در بررسی Winters و همکاران (۱۹) و Denis و همکاران (۲) این درصد به ترتیب ۸۰ و ٦٦/۳ درصد گزارش گردیده استبا توجه به نقش ماکیان در انتقال عفونت های کامپیلوباکتری به انسان و عدم انجام مطالعه تحقیق در مورد فراوانی گونه های مهم کامپیلوباکتر در این حیوانات در ایران و نیز وجود اشکالاتی در تشخیص این باکتری ها به روش بیوشیمیایی ما بر آن شدیم تا با استفاده از روش PCR فراوانی باکتری ها را در مرغ ها بررسی و نتایج را با نتایج حاصل از روش کشت مقایسه نمائیم.

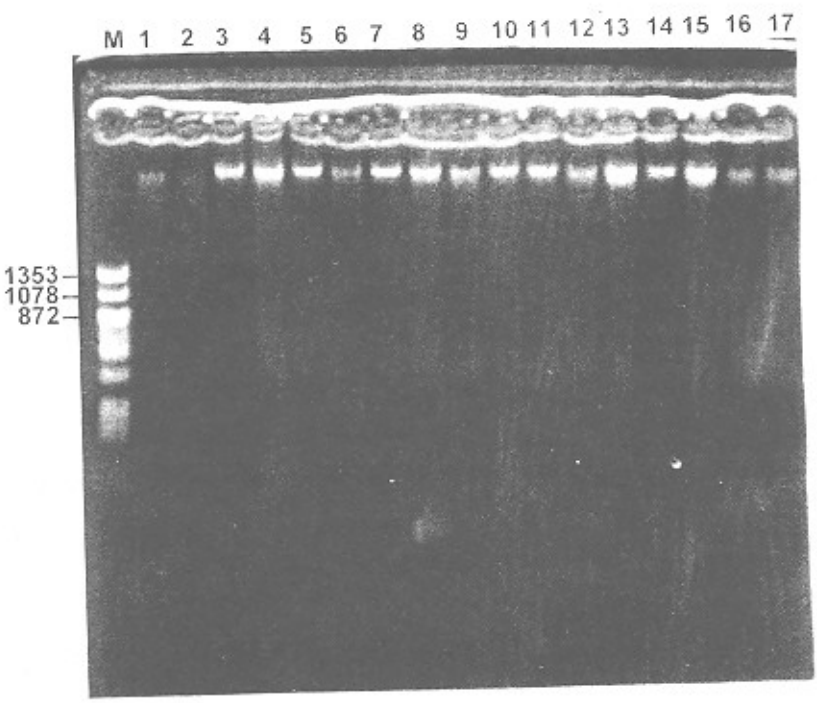
## مواد و روشها:

در این بررسی تعداد ۱۱٦ نمونه بصورت رکتال سواپ از مرغ های موجود در مرغداری های شهر اصفهان به صورت تصادفی گرفته شد و پس از ۱۲ الی ۱۸ ساعت غنی سازی در محیط Campy Thio، در سطح محیط اختصاصی Campylobacter selective agar حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و آنتی بیوتیک های وانکومایسین، پلی میکسین و تری متوپریم به صورت خطی کشت گردید. پس از ٤۸ ساعت انکوباسیون در شرایط میکروآئروفیلیک و دمای ٤۲ درجه سانتیگراد کلنی های مشکوک بررسی شده و پس از رنگ آمیزی گرم، با استفاده از تست های کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز هیپورات و تعیین حساسیت به دیسک های ۳۰ میکروگرمی سفالوتین و نالیدیکسیک

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

اسید گونه کامپیلوباکتری ها تعیین گردید. به منظور استخراج DNA از نمونه ها از کیت های High Pure PCR Template Preparation Kit (شرکت Roche آلمان) استفاده گردید. برای این منظور، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون غنی شده باکتری ها در محیط Campy-Thio به مدت ۱۰ دقیقه در دور پائین (۲۰۰۰ rpm) سانتریفوژ گردید و سپس محلول رویی جدا شده و در دور بالا (۸۰۰۰rpm) مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. با افزودن لیزوزیم و بافرفسفات به رسوب حاصله، نمونه ها مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و پس از افزودن ایزوپروپانول، نمونه ها وارد فیلتر تیوب شده و پس از سانتریفوژ به آنها Inhibitor removal buffer اضافه گردید. پس از سانتریفوژ مجدد، Wash buffer به نمونه ها اضافه شد و مجدداً پس از سانتریفوژ Elution buffer به آنها اضافه گردید و با انجام سانتریفوژ، DNA نمونه ها به صورت خالص جمع آوری گردید. با استفاده از اسپکتروفتومتر U.V دانسیته نوری نمونه ها تعیین و مقدار DNA هر نمونه معین گردید. برای انجام PCR از دو سری پرایمر اختصاصی گونه استفاده گردید که یک سری از آنها (JEJ1-JEJ2) ویژه گونه ژژونی و سری دیگر (COL1-COL2) ویژه گونه کلی بودند (٦).

غلظت های مورد استفاده جهت PCR در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر با انجام تغییراتی در غلظت های معرفی شده (٦) به شرح زیر بود:




**تصویر شماره ۱:** الکتروفورز محصول استخراج و تخلیص DNA از سویه های کنترل و نمونه های ماکیان.
*M مارکر وزن مولکولی، ۳-۱: سویه های کنترل به ترتیب C. coli Lior8, C. jejuni Lior2, C. jejuni Lior1 می باشند.*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

| | |
|---|---|
| KCL | 50 mM |
| Tris-HCL(PH 8.3) | 10mM |
| Gelatin | 0.001% |
| $MgCl_2$ | 3mM |
| dNTP | 0.2 mM |
| Primers | 200 pM |
| Taq DNA polymerase | 0.5 U |

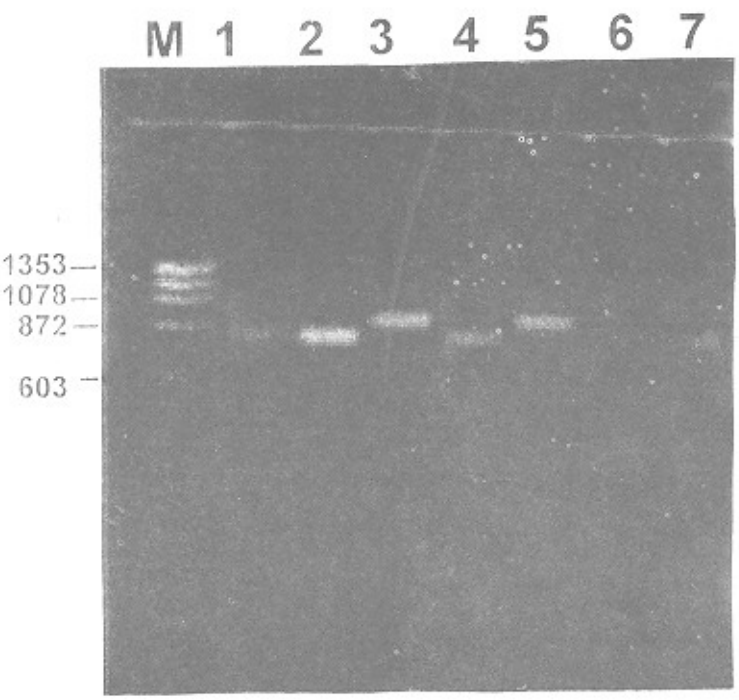
پس از تهیه و توزیع Reaction mix در لوله ها (Thin walled PCR tubes) مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده از نمونه ها به هر یک از این لوله ها افزوده شده و پس از افزودن ۳۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل، لوله ها وارد دستگاه ترمال سایکلر (HIBAID Omni Gene) شده و در ۳۰ دور PCR با stringency بالا شرکت داده شدند (۶).

## نتایج:

از مجموع ۱۱۶ نمونه کشت داده شده، جمعاً تعداد ۱۱ نمونه از نظر کشت مثبت گردید که این تعداد ۹/۴ درصد کل نمونه ها را تشکیل می داد. نتیجه تست های کاتالاز و اکسیداز تمام سویه ها مثبت بود و همه آنها نسبت به سفالوتین مقاوم و نسبت به نالیدیکسیک اسید حساس بودند.

نتیجه تست هیدرولیز هیپورات در ۸ مورد مثبت و در ۳ مورد منفی گردید. بدین ترتیب بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی ۷۲ درصد سویه ها متعلق به گونه ژژونی و ۲۸ درصد بقیه متعلق به گونه کلی بودند.

نتیجه استخراج و تخلیص DNA در همه موارد مثبت بود و گر چه که از نظر میزان استخراج تفاوت هایی بین نمونه های مختلف به چشم می خورد




**تصویر شماره ۲:** الکتروفورز محصول PCR اسیدهای نوکلئیک جدا شده از سویه های کنترل و نمونه های ماکیان.
*M:مارکر وزن مولکولی، ۳-۱: سویه های کنترل که به ترتیب C. coli Lior8, C. jejuni Lior2, C. jejuni Lior1 می باشند، ۷و۴: نمونه های ماکیان حاوی کامپیلوباکترژژونی، ۵: نمونه حاوی کامپیلوباکتر کلی، ۶: نمونه اسهالی فاقد کامپیلوباکترژژونی یا کامپیلوباکترکلی*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

**جـدول شـمارهٔ ۱**: توزیـع فراوانـی نتایج کشت و PCR نمونه های رکتال سواپ مرغ ها

| نتیجه کشت / نتیجه PCR | مثبت | | منفی | | جمع | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد |
| مثبت | ۱۱ TP | ۹/٤ | ۱٦ FP | ۱۳/۷ | ۲۷ | ۲۳/۲ |
| منفی | ۰ FN | ۰ | ۸۹ TN | ۷٦/۷ | ۸۹ | ۷/۷٦ |
| جمع | ۱۱ | ۹/٤ | ۱۰۵ | ۹۰/٤ | ۱۱٦ | ۱۰۰ |

*در تمامی مواردی که کشت مثبت داشته است PCR نیز مثبت بوده است در مقابل تمامی مواردی که کشت منفی شده PCR نیز منفی گردیده است که نشان دهنده حساسیت و ویژگی بالای تست PCR در مقایسه با کشت می باشد.*

*TN: منفی حقیقی  FP: مثبت کاذب  TP: مثبت حقیقی*

FN: منفی کاذب

ولـی ایـن تفـاوت ها اخـلالی در عمـل PCR ایجـاد نمی کرد (تصویر شماره ۱).

از مجمـوع ۱۱٦ نمونـه مـرغ هـا که مورد استخراج DNA و انجـام PCR قـرار گرفتـند. تعـداد ۲۷ نمونه از نظر PCR مثبـت شـدند که این تعداد ۲۳/۲ درصد کل نمونه ها را تشـکیل می داد. از این تعداد ۱۸ مورد با پرایمرهای ویژه کامپیلوباکترژژونـی و ۹ مـورد نـیز بـا پرایمـر هـای ویـژه کامپیلوباکترکلی تکثیر (Amplify) شـدند (تصویر شماره ۲).

بدیـن ترتیـب بـر اسـاس نتایج PCR، ٦٦/۷ درصد سـویه هـای جـدا شده متعلق به گونه ژژونی و ۳۳/۳ درصد بقـیه مـتعلق بـه گونـه کلـی بودنـد. تمام موارد مثبت از نظر کشـت (۱۱مـورد) از نظر PCR نیز مثبت شدند مضافاً اینکه در ۱٦ مـورد نـیز نتـیجه PCR مثبت ولی نتیجه کشت منفی بود. در بقیه موارد (۸۹ مورد) نتیجه کشت و PCR توأمـا منفی گردید (جدول شمارهٔ ۱).

## بحث:

در بررسـی حاضـر، ۹/٤ درصـد نمونـه ها از نظر کشـت مثبـت شـدند. آمـار مـربوط بـه جداسـازی کامپیلوباکـترها از دسـتگاه گـوارش مرغ ها به روش کشت اخـتلاف زیـادی را نشـان می دهد. به عنوان مثال در برخی بررسی ها ۳۰ تا ۱۰۰ درصد مرغ ها را حامل کامپیوباکتر به صـورت فلور نرمال دستگاه گوارش دانسته اند (٤). این در حالـی اسـت کـه در بررسی Magistrado و همکاران (۱۱) کـه بـر روی ۱۳۵ نمونـه ماکیان صورت گرفته، ۵/۹ درصد کـل نمونـه هـا از نظـر کشـت کامپیلوباکـتر مثبـت گزارش گـردیده است. در مورد علت این اختلاف آماری گزارشی ارائه نشده است.

بـــر اساس آزمـــایشات بیوشیمیایی ۷۲ درصد سـویه هـای جدا شده از مرغ ها متعلق به گونه ژژونی و ۲۸ درصـد مـتعلق بـه گونـه کلـی بودند. آمار مربوط به درصد جداسـازی گونـه هـای ژژونی و کلی از نمونه های ماکیان بـه روش بیوشـیمیایی اخـتلاف زیادی را نشان می دهد. در برخـی بررسـی هـا گونـه ژژونـی را مسـئول ۹۹ درصـد آلودگـی هـای کامپیلوباکتری در ماکیان می دانند (۱٤) در حالـی کـه در بررسـی Van Looveren درصـد جدا سازی گونـه هـای ژژونـی و کلـی بـه ترتیـب ۷۹ و ۲۱ درصـد گـزارش شـده (۱۷) و در بررسـی Eyigor و همکـاران این آمـار به ترتیب ٦۷ و ۳۳ درصد گزارش گردیده است (۵). در بررسـی Magistrando و همکـاران از مجمـوع ۸ سویه کامپیلوباکـتر جـدا شـده از ماکـیان، ۳ سـویه متعلق به گونه ژژونـی و ۵ سـویه متعلق به گونه کلی گزارش شده است ( ۱۱).

نتیجه PCR نمونـه ها در ۲۷ مورد (۲۳/۲درصد)

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

مثبت بود که از این تعداد، ۱۸ نمونه با پرایمرهای ویژه کامپیلوباکترژژونی و ۹ نمونه با پرایمرهای ویژه کامپیلوباکترکلی آمپلیفای شدند. آمار مربوط به تشخیص کامپیلوباکتر در نمونه های ماکیان به روش PCR نیز متفاوت می باشد. به عنوان مثال در بررسی Eyigor و همکاران (۵) و Grennan و همکاران (۸) ۱۰۰ درصد نمونه ها از نظر PCR مثبت گزارش شده اند در حالی که در بررسی Winters و همکاران (۱۹) و Denis و همکاران (۲) به ترتیب ۸۰ و ٦٦/۳ درصد نمونه ها از نظر PCR مثبت گزارش گردیده است.

در بررسی Studer و همکاران ٦٨ درصد نمونه های مورد بررسی از نظر PCR مثبت گردیده اند (١٦) و این در حالی است که در بررسی Magistrando (۱۱) تنها ۵/۹ درصد نمونه ها از نظر PCR مثبت گزارش شده است.

حساسیت (sensitivity) و ویژگی (specificity) روش PCR در مقایسه با روش کشت در بررسی حاضر به ترتیب ۱۰۰ و ۸٤/۷ درصد بود. در بررسی Linton و همکارانش (۱۰) حساسیت و ویژگی روش PCR در مقایسه با کشت ۱۰۰ درصد گزارش گردیده است. در مطالعهٔ Stonnet و همکاران نیز نتایج مشابهی گرفته شده است (۱۵). در حالی که در بررسی Vanniasinkam (۱۸) حساسیت و ویژگی روش PCR در مقایسه با کشت به ترتیب ۹۱ و ۹۷ درصد گزارش گردیده است. بدین ترتیب نتایج حاصل از بررسی حاضر قابل مقایسه با نتایج سایر محققان می باشد. از آنجا که روش PCR در مقایسه با روش کشت قادر به تشخیص موارد مثبت بیشتری بود (۲۷ مورد در مقایسه با ۱۱ مورد) به نظر می رسد که روش PCR جایگزین مناسبی جهت روش PCR در تشخیص کامپیلوباکترهای ترموفیلیک در نمونه های مرغها باشد. علت منفی شدن کشت (با وجود مثبت شدن PCR) احتمالاً عدم رشد برخی سویه های کامپیلوباکتر در محیط کشت اختصاصی می باشد. برخی بررسی ها حاکی از آن است که گونه کلی نسبت به آنتی بیوتیک های موجود در محیط های کشت انتخابی (به ویژه کلیستین و آمفوتریسین) حساس تر از گونه ژژونی می باشد (۷). در عین حال، غنی سازی در محیط های غنی کننده نیز گاهی اوقات منجر به تشدید رشد گونه کلی در مقابل گونه ژژونی می گردد (۳).

وجود فاصله طولانی بین نمونه گیری و کشت نیز موجب منفی شدن نتیجه کشت می گردد. به عنوان مثال در بررسی Mahendru و همکاران (۱۲) نتیجه PCR نمونه های کشت مثبت ماکیان بعد از یک هفته نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی گراد مثبت بوده است. در حالی که نتیجه کشت این نمونه ها پس از این مدت منفی گشته است. نتایج حاصل از تعیین گونه وسط روش بیوشیمیایی در بررسی حاضر کاملاً با نتایج مربوط در روش PCR تطابق داشت. بدین ترتیب با توجه به حساسیت مناسب روش PCR و سرعت عمل آن و نیز عدم رشد برخی سویه ها در محیط های کشت انتخابی (به ویژه در مورد نمونه های ماکیان که تعداد باکتری اندک می باشد) توصیه می گردد که این روش به عنوان یک روش جایگزین روش کشت مورد استفاده قرار گیرد و یا حداقل در مواردی که نتیجه کشت نمونه ها منفی شده است از این روش جهت اطمینان از نتایج حاصله استفاده گردد.

از آنجا که بسیاری از عفونت های کامپیلوباکترژژونی و کامپیلوباکترکلی ناشی از مصرف گوشت ماکیان می باشد (۱) و از طرف دیگر در بسیاری

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

از مطالعات مربوط به جداسازی کامپیلوباکترها از ماکیان، درصد بالایی از این حیوانات ناقل این باکتری ها گزارش گردیده است (٤). لذا به نظر می رسد برای کنترل اسهال های ناشی از کامپیلوباکترها بایستی در تولید و مصرف گوشت و تخم ماکیان دقت کافی به عمل آید.

## تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از زحمات دکتر Traute Vardund از انیستیتو بهداشت عمومی Folkehelsa اسلو (نروژ) به جهت تهیه و ارسال سویه های کنترل کامپیلوباکتر و همینطور بخش سلولی و مولکولی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به جهت همکاری درانجام آزمایشات PCR قدردانی می گردد.

## Reference:

1. Blaser M. *Campylobacter jejuni* and related species. In: Mandell GL.; Douglas RG.; Bennett JE.; Dolin R. Principles and practices of infectious diseases: From Churchill Livingstone. Philadelphia: USA, Vol.2. 2276 -85, 2000.
2. Denis M.; Refregier Petton J.; Laisney MJ.; Ermel G.; et al. Campylobacter contamination in french chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter Coli*. J Appl Microbiol, 91(2): 255-67, 2001.
3. Denis M.; Soumet C.; Rivoal K.; Ermel G.; et al. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *campylobacter jejuni* and *Campylobacter Coli*. Lett Appl Microbiol, 29(6): 406-10, 1999.
4. D'Sullivan NA.; Fallon R.; Carrol C.; Smith T.; et al. Detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chicken samples using a PCR /DNA probe membrane based colorimetric detection assay. Mol Cell Probes, 14(1): 7-16, 2000.
5. Eyigor A.; Dawson KA.; Langlois BE.; Pickett CL. Detection of cytolethal distending toxin activity and cdt genes in *Campylobacter spp*. isolated from chicken arcasses. Appl Environ Microbiol, 65(4): 1501-5, 1999.
6. Gonzalez I.; Grant KA.; Richardsons PT.; Park SF.; et al. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacer jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the ceu E gene encoding a putative virulence determinant. J Clin Microbiol, 35: 759-63, 1997.
7. Goossens H.; Boeck M.; Coignau H.; Vlaes L.; et al. Modified selective medium for isolation of *Campylobacter spp*. from feces: comparison with Preston medium, a blood-free medium and a filtration system. J Clin Microbiol, 24(5): 840-3, 1984.
8. Grennan B.; O'Sullivan NA.; Fallon R.; Carronll C.; et al. PCR-ELISAs for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry samples. Biotechniques, 30 (3): 602-6, 2001.
9. Guerrant RL. *Campylobacter enteritis*. In: Cecil RL.; Goldman L. Textbook of medicine: From WB Saunders Company. Philadelphia: USA, Vol. 3. 1687-90, 2000.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 12:59 +0430 on Monday September 4th 2017

10. Linton D.; Lawson AJ.; Stanly RJ. PCR detection. identification to species level and fingerprinting of *Campylobactar jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol, 35: 2568-72, 1997.

11. Magistrado PA.; Garcia MM.; Raymundo AK. Isolation and polymerase chain reaction-based detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in the Philippines. Int J Food Microbiol, 70(1-2): 197-206, 2001.

12. Mahendru M.; Prasad KN.; Dhole TN.; Ayyagari A. Rapid identification of *Campylobacter jejuni* strains by polymerase chain reaction and their restriction fragment length polymorphism analysis. Indian J Med Res, 105: 9-14, 1997.

13. Moore JE.; Murphy PG. Hippurote hydorolysis and speciation of thermophilic *Campylobacter spp*, British Journal of Biomedical. Scinces, 57(2): 180-2; 2000.

14. Ng LK.; Kingombe CI.; Yan W.; Taylor DE.; et al. Specific detection and confirmantion of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. Appl Environ Microbiol, 63(11): 4558-63, 1997.

15. Stonnet VL.; Sicinschi F.; Megraud JL.; Guesdon R. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from clinical specimens using the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 14(4): 355–9s, 1995.

16. Studer E.; Luthy J.; Hubner P. Study of the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in sand samples from four Swiss chicken farms. Res Microbiol, 150(3): 213-9, 1999.

17. Van Looveren M.; Doube G.; De Zutter L.; Dumont JM.; et al. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter strains* isolated frome food animals in Belgium. J Antimicrob Chemother, 48(2): 235-40, 2001 .

18. Vanniasinkam T.; Lanser JA.; Barton MD. PCR for detection of *Campylobacter spp*. in clinical specimens lett. Appl Microbiol, 28(1): 52–9, 1999.

19. Winters D.; O'Leary AE.; Slavik MF. Rapid PCR with nested primers for direct detection of *Campylobac`ter jejuni* in chicken washes. Mol Cell Probes, 11(4): 267-71, 1997.