

Tavuk Orijinli *Campylobacter*'lerin İmmunoblotting ile Analizi*

Mehmet AKAN, Jale ERDEĞER, Ziya İLHAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 16.08.2001

Özet: Bu çalışmada, tavuklardan izole edilen termofilik *Campylobacter* suşlarında bulunan immunojenik yapıların immunoblot tekniği ile ortaya konması amaçlandı.

Suşların tüm hücre proteinlerinin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) ile analizinde, *C. jejuni* suşlarının bant profillerinin 10,8 kD ile 116,5 kD arasında dağılım gösterdiği saptandı. Tüm *C. jejuni* suşlarında 78, 63, 52, 48,5, 43,5, 29,8, 25,6, 22, 18,5, 17,2 ve 16,5 kD bantları ortak majör bantlar olarak belirlendi. *C. coli* suşlarının elektroforetik analizleri sonrasında protein bant profilleri 10,3 ile 118 kD arasında dağılım gösterdiği ve majör bantların 76, 63-62, 52, 48,5, 44 ve 30,5 kD olduğu gözlemlendi.

İmmunoblot çalışmalarında, *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarında ortak 67, 63, 43 ve 31 kD'lık antijenik yapılar saptandı. *C. jejuni* suşlarına spesifik olarak ayrıca 27 kD'lık, *C. coli* suşlarında ise 38 kD'lık spesifik bantlar belirlendi. *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarına karşı hazırlanan immün serumlar ile yapılan çapraz immunoblot denemelerinde herhangi bir fark saptanamadı.

Sonuç olarak, *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarında elektroforetik analiz sonrasında elde edilen protein profillerinin ve immuniteye esas olan protein yapılarının benzer olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: *Campylobacter*, immunoblotting, SDS-PAGE, tavuk

Immunoblot Analysis of *Campylobacters* of Chickens

Abstract: The aim of this study was to determine immunogenic structures by immunoblotting in thermophilic *Campylobacter* strains isolated from chickens.

The bands obtained from *C. jejuni* strains were found to be distributed between 10.8 and 116.5 kD by SDS-PAGE analysis of whole cell proteins. The bands 78, 63, 52, 48.5, 43.5, 29.8, 25.6, 22, 18.5, 17.2 and 16.5 kD were detected as the major common bands in all *C. jejuni* strains. Electrophoretic analysis of *C. coli* strains revealed that protein band profiles ranged between 10.3 and 118 kD, and 76, 63-62, 52, 48.5, 44 and 30.5 kD bands were all major bands.

Common antigenic structures with 67, 63, 43 and 29-31 kD were observed in the immunoblot analysis (Western blotting) of *C. jejuni* and *C. coli* strains. In addition, specific bands with 27 kD and 38 kD were detected in *C. jejuni* and *C. coli* strains, respectively. There was no difference in the cross immunoblot analysis carried out with immune sera prepared against *C. jejuni* and *C. coli* strains.

In conclusion, protein profiles and immunogenic structures obtained by electrophoretic analysis of *C. jejuni* and *C. coli* strains were found to be similar.

Key Words: *Campylobacter*, immunoblotting, SDS-PAGE, chicken

Giriş

Campylobacter jejuni ve *Campylobacter coli*, tüm dünyada insanlarda akut diareye neden olan en önemli etkenlerdendir. *C. jejuni* ve *C. coli* hayvanların bağırsak kanalında ve hayvansal kaynaklı gıdalarda sıklıkla bulunur ve insanlar için potansiyel bir risk oluştururlar (1).

İnsan sağlığı açısından önemli bir problem olan *C. jejuni* ve *C. coli*, özellikle kanatlı hayvanların etlerinden sıklıkla izole edilmektedirler. Bu patojenlerin kanatlı hayvanlarda kontrolü için ilk aşamada, etkenlerin bağırsaklara kolonizasyonunun önlenmesi ve dolayısıyla kanatlı etlerinin işlenmesi aşamasında kontaminasyonun

* Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No 97.10.00.20) tarafından desteklenmiştir.

önüne geçilmesiyle mümkün olacağı bildirilmiştir (2,3). Bu etkenlerin tavuk bağırsaklarına birinci haftadan sonra kolonize olduğu belirlenmiştir (4,5). Yapılan çalışmalarda tavuk ve insanlardan izole edilen *C. jejuni/coli* suşları arasında benzerliğin olduğu gösterilmiştir (6,7,8). Hayvansal kaynaklardan izole edilen *C. jejuni/coli* suşlarının tüm hücre proteinleri, dış membran proteinleri ve lipopolisakkarit yapıları elektroforetik yöntemlerle değişik araştırmacılar tarafından incelenmiş ve bu yöntemlerle *Campylobacter* suşları arasında benzerliklerin ortaya konabileceği bildirilmiştir (9-12).

Son yıllarda kanatlı hayvanlarda *Campylobacter* infeksiyonlarının önlenmesi amacıyla aşı çalışmaları başlamıştır. Ancak konu ile ilgili oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır (13,14,15). Glünder ve Spiering (14) ve Ge ve ark. (15), inaktif yağ emülsiyonlu aşular ile kanatlı hayvanlarda *Campylobacter* kolonizasyonunun azaltılabileceğini bildirmişlerdir. *Campylobacter* infeksiyonlarında oluşan bağışıklıkta rol oynayan başta flagella olmak üzere major antijenik yapılar belirlenmiştir (16,17). İmmunitede rol oynayan major antijenlerin araştırıldığı bir çalışmada, molekül ağırlıkları 28-31 arasında olan dört antijen purifiye edilmiştir. Bu antijenlerden 28 ve 30 kD'lık antijenlerin hem *C. jejuni* ve hem de *C. coli* ile infekte hasta serumları ile yapılan analizde ortak antijen olduğu ortaya konmuştur (16).

Bu çalışmada, tavuklardan izole edilen termofilik *Campylobacter* suşlarının protein profillerinin ve immunojenik yapılarının belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Suşlar: Çalışmada 12 farklı kümese (Ankara ve Bolu çevresinde) ait tavukların dışkılarından izole edilen 112 *C. jejuni* ve 7 kümeden izole edilen 56 *C. coli* suşu kullanıldı. Bu suşlar, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan sağlandı. Tüm suşlar -70 °C'de saklanan Brucella buyyondan (Oxoid), Mueller-Hinton agara (Difco) pasajlandı ve üretilmeleri mikroaerofilik koşullarda gerçekleştirildi. Üretilen termofilik *Campylobacter* suşlarının identifikasyonları morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve tolerans özellikleri değerlendirilerek yapıldı (18).

SDS-PAGE: Ayırıcı jel %10'luk dizici jel ise % 4'lük hazırlandı. Ayırıcı jelin hazırlanması için, 20 ml monomer solusyonu (58.4 g akrilamid (Sigma), 1.6 g bisakrilamid

(Sigma), 140 ml distile su), 15 ml ayırıcı jel solusyonu (4xRGB, 36.3 g Tris (Sigma), distile su ile 200 ml'ye tamamlandı), 0.6 ml SDS (%10'luk; Merck) ve 24.1 ml distile su ile karıştırıldı. Vakum ile degaz işlemi uygulandı. Karışıma 300 µl amonyum persülfat (%10'luk, APS; Sigma) ve 20 µl TEMED (Sigma) katılarak polimerizasyon işlemi başlatıldı. Karışım önceden hazırlanmış olan 1.5 mm boşluklu cam plakalar (16x18 cm) arasına üstte yaklaşık 4 cm kalacak şekilde döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için 1-2 saat beklendi. Dizici jelin karışımında ise 2.66 ml monomer solusyonu, 5 ml dizici jel solusyonu (4xSGB, 3 g Tris, distile su ile 50 ml'ye tamamlandı) 0.2 ml SDS (%10'luk) ve 12.2 ml distile su karıştırıldı, degaz işlemi uygulandı ve polimerizasyonun başlatılması için APS (100 µl) ve TEMED (10 µl) ilave edildi. Solusyon cam plakaların boş kalan kısmına dolduruldu ve örnek çukurlarını oluşturmak için arasına 1.5 mm kalınlığında tarak yerleştirildi. Polimerizasyonun tamamlanması için birkaç saat beklendikten sonra tarak çıkartıldı. Oluşan boşluklar distile su ile yıkandı.

Campylobacter suşları katı besiyerinde üretildikten sonra izci boya (%0.1 bromfenol mavisi; Sigma) içeren 2x lizis buffer (3 ml 4xSGB, 4 ml %10'luk SDS, 2 ml gliserol (Sigma), 1 ml 2-merkaptolanol (Sigma), 0.5 ml distile su; pH:6,8) içinde süspanse edildi. Örnekler ısı işlemine tabi tutulduktan sonra her çukura önce tank buffer sonra 20 µl örnek mikroenjektör ile yüklendi. Her jelin bir gözüne aynı şekilde işlenmiş protein molekül ağırlık standardı (Sigma) yerleştirildi. Elektroforez işlemi denatüre koşullarda, kademeli sistemde vertikal slab jel ünitesinde (Hofer SE-600) sabit amperde yapıldı (19).

Elektroforez işlemi bittikten sonra jel cam sandviçlerden ayrılarak fiksatif-boya (800 ml metanol (Sigma), 140 ml asetik asit (Sigma), 0.5 g coomasie blue R-250 (Sigma), 1060 ml distile su) solusyonunda 2-4 saat bekletildi. Renk giderme amacıyla jel 1. boya giderici solusyonunda 1 saat, 2. boya giderici solusyonunda zemin rengi şeffaflaşınca kadar bekletildi.

Elektroforez işleminden sonra her bir standart proteinin relatif mobilitesi (R_f) hesaplandı (R_f : jel başlangıcından protein bandına kadar olan mesafe/jel başlangıcından izci boyanın ulaştığı noktaya kadar olan mesafe). R_f değerleri logaritmik kağıt üzerine yerleştirip kalibrasyon doğrusu elde edildi. *Campylobacter*'lere ait protein bantlarının R_f 'leri aynı şekilde hesaplanıp kalibrasyon doğrusu vasıtasıyla molekül ağırlıkları bulundu.

İmmünizasyon: Çalışmada, elektroforetik analizler sonrasında farklı kümeslerden seçilen 3 adet *C. jejuni* (TDJ7, TDJ13, TDJ26) ve 2 adet *C. coli* (TDC2, TDC6) suşları immünizasyon antijeni olarak kullanıldı. Antijen hazırlamak için suşlar, Mueller Hinton agarda üretildi ve formollü PBS ile toplandı. Toplanan süspansiyonlar 3 kez yıkandı ve dipte kalan tortu kullanılarak yoğunluk, spektrometrede 530 nm de 10 x 1,5 OD'ye ayarlandı. Bu işlem sonrasında hazırlanan süspansiyon immünizasyonda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

İmmünizasyon işlemi, her suş için ayrı ayrı olmak üzere, *Campylobacter* yönünden mikrobiyolojik olarak negatif bulunan 4 haftalık yaştaki 2 adet tavuğa *C. jejuni* ve *C. coli* tüm hücre antijeni 4 gün ara ile 6 kez intramuskuler olarak (0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,5 ml, 0,8 ml, 1 ml) inokule edildi. Son inokulasyondan 10 gün sonra alınan kanların serumu çıkarıldı ve serumlar -20 °C'de saklandı.

İmmunoblot: Elektroforez sonrasında protein profillerine göre farklı olduğu belirlenen suşlar, immünize edilen tavuklardan elde edilen serumlar ile karşılaştırmalı olarak immunoblot analizine tabi tutuldu. Bu işlem için öncelikle suşlardan hazırlanan tüm hücre proteinleri jele yüklendi ve jel ortamında yaklaşık 4 saat süreyle ve 30 mA sabit amperde koşturuldu ve daha sonra elektroforez işlemi ile ayrılan protein bantları nitroselüloz membrana (0,2 µm, Sigma) aktarıldı (20,21). Transfer işlemine başlamadan önce poliakrilamid jel transfer buffer içinde yıkandı (0,1920 M glisin (Sigma), 0,0250 M tris (pH 8,3), 0,0013 M SDS ve %10 metanol), transfer sabit akımda (0,8 mA/cm² jel) ve oda ısısında 60 dak. gerçekleştirildi. Nitroselüloz membran, %5 süttezu (Merck) içeren PBS-Tween 20 (Merck) içinde 1 saat bloklandı. PBS-Tween 20 içinde 3 kez yıkandıktan sonra sulandırılmış immün serum (1/100) ile 1 saat muamele edildi. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı ve nitroselüloz membran 1/1000 oranında sulandırılan peroksit ile konjuge anti-tavuk IgG konjugat (Sigma) ile 1 saat inkube edildi. İnkubasyonu takiben yıkanan membran, kolorimetrik reaksiyon görülünceye kadar substrat (3-3 diaminobenzidin, Sigma) ile muamele edildi. Nitroselüloz membran su ile çalkalanarak reaksiyona son verildi. İmmunoblotting sırasında tüm işlemler oda ısısında gerçekleştirildi. Sonuçlar gözle, oluşan kahverengi renkli bantlara göre değerlendirildi. İmmunoblot işlemi her serum ile ayrı ayrı tekrarlandı.

Bulgular

İmmünizasyon bulguları: Elde edilen serumların titreleri aglutinasyon testi ile saptandı. Serumların aglutinasyon titreleri Tablo 1'de sunulmuştur. *C. jejuni* suşlarından TDJ7 ve TDJ26 ile immünize edilen tavuklardan alınan serumlar 1:1024 titrede pozitif sonuç verirken TDJ13 suşunda bu değer 1:512 olarak bulundu. *C. coli* suşları ile yapılan aglutinasyon testinde serumun antikor titresini 1:512 olarak saptandı.

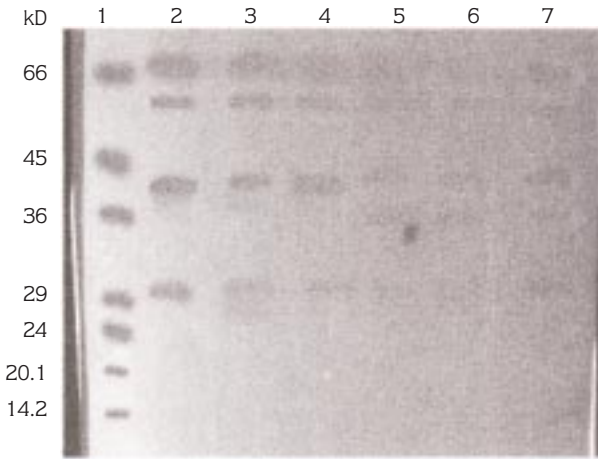
SDS-PAGE bulguları: Farklı kaynaklardan izole ve tanımlanmış *Campylobacter* suşlarının tüm hücre proteinleri, SDS-PAGE ile analiz edildi. Elektroforetik analiz sonrasında, *C. jejuni* suşlarının bant profilleri 10,8 kD ile 116,5 kD arasında dağılım gösterdi. Tüm *C. jejuni* suşlarında 78, 63, 52, 48,5, 43,5, 29,8, 25,6, 22, 18,5, 17,2 ve 16,5 kD bantları ortak majör bantlar olarak belirlendi. *C. coli* suşlarının elektroforetik analizleri sonrasında protein bant profilleri 10,3 ile 118 kD arasında dağılım gösterdiği ve majör bantların 76, 63-62, 52, 48,5, 44 ve 30,5 kD olduğu gözlemlendi.

İmmunoblot bulguları: Analiz sonrasında tüm serumlar ile *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarında ortak 67, 63, 43 ve 29-31 kD'lık antijenik yapılar saptandı (Şekil 1). *C. jejuni* suşlarına spesifik olarak ayrıca 27 kD'lık, *C. coli* suşlarında ise 38 kD'lık spesifik bantlar belirlendi. *C. jejuni* immünserumları ile *C. jejuni* suşlarında 28-31 kD ve 40-43 kD'da yoğun bantlar tespit edildi. *C. jejuni* suşlarına karşı hazırlanan immünserumlar ile yapılan çapraz immunoblot analizinde herhangi bir fark saptanamadı.

C. coli suşları ile hazırlanan immünserumlarla yapılan *C. coli*'lerin analizinde 29-30 kD ağırlığında yoğun bantlar belirlendi. *C. coli* suşlarına karşı hazırlanan iki immünserum arasında çapraz immunoblot analizinde herhangi bir fark saptanamadı.

Tablo 1. *C. jejuni* ve *C. coli* ile immünize edilen tavukların serum aglutinasyon titreleri.

Suş no	Agglutinasyon titreleri
<i>C. jejuni</i> TDJ7	1: 1024
<i>C. jejuni</i> TDJ13	1: 512
<i>C. jejuni</i> TDJ26	1: 1024
<i>C. coli</i> TDC2	1: 512
<i>C. coli</i> TDC6	1:512



Şekil 1. *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarının immunoblot analizi (1= molekül ağırlık standartları, 2.,3.ve 4.= *C. jejuni*, 5.,6. ve 7.= *C. coli*).

Tartışma

Campylobacter jejuni ve *Campylobacter coli*, insanlarda akut diareye neden olan ve hayvanların bağırsak kanalında bulunan mikroorganizmalardır. İnsanlarda *C. jejuni/coli* nedenli infeksiyonlarda hayvansal kaynaklı gıdalar önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, tavuklardan izole edilen termofilik *Campylobacter* suşlarının elektroforetik protein profillerinin belirlenmesi ve sonrasında immunoblotting ile immunojenik yapıların ortaya konulması amaçlandı.

SDS-PAGE ile bakterilerde tüm hücre, LPS veya OMP yapıları ortaya konabilmekte ve suşlar arasında benzerlikler belirlenebilmektedir. Bu çalışmada elektroforetik analiz için farklı kümeslerden seçilen *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarının tüm hücre protein profilleri saptandı. Tüm *C. jejuni* suşlarında 78 , 63 , 52 , 48,5 , 43,5 , 29,8 , 25,6 , 22 , 18,5 , 17,2 ve 16,5 kD bantları ortak majör bantlar olarak belirlendi. *C. coli* suşlarında ise 76 , 63-62 , 52 , 48,5 , 44 ve 30,5 kD olduğu gözlemlendi. Her iki türde de elde edilen protein bantlarının benzer olduğu saptandı. Bu benzerlik kanatlı orijinli *C. jejuni/coli* suşlarında protein profilleri bakımından büyük bir farklılık olmadığını gösterdi. Konu ile ilgili bir çalışmada Akan ve ark. (4), aynı kümeden izole edilen suşlar arasında %96,6-100, farklı kaynaklardan izole edilen *Campylobacter* suşları arasında %87,8-93,5 düzeyinde bir benzerlik saptamışlardır. *Campylobacter* suşlarının elektroforetik analizleri çoğunlukla OMP ve LPS yapıları üzerine yoğunlanmış ve bu çalışmalar sonrasında *Campylobacter* türlerinin birbirlerinden tür düzeyinde ayrımlanabileceği üzerinde durulmuştur (9,12). Bu

çalışmada elde edilen sonuçlar Akan ve ark. (4)'nın çalışmalarına benzer olmasına karşın diğer çalışmalarla bir karşılaştırma yapılamamıştır. Bunun nedeni ise bu araştırmada sadece tüm hücre protein profillerinin incelenmesine karşın LPS ve OMP ile ilgili sonuçların olmamasıdır.

Elektroforetik analiz sonrasında seçilen suşlar, hazırlanan farklı hiperimmun serumlar ile hem *C. jejuni* hem de *C. coli* suşları immunoblot analizi ile değerlendirildi. Bu değerlendirmede, tüm serumlar ile *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarında ortak 67, 63, 43 ve 29-31 kD'lık antijenik yapılar olduğu belirlendi. *C. jejuni* immunserumları ile *C. jejuni* suşlarında 28-31 kD ve 40-43 kD'da, *C. coli* suşları ile hazırlanan immunserumlarla yapılan *C. coli*'lerin analizinde ise 29-30 kD ağırlığında yoğun bantlar tespit edildi. Ayrıca *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarına karşı hazırlanan immunserumlar ile yapılan çapraz immunoblot analizinde herhangi bir fark saptanamadı. Bu bulgular ile *C. jejuni* ve *C. coli* suşları arasında antijenik bakımdan büyük bir benzerlik olduğu ve tür düzeyinde suşlar arasında da antijenik yapı olarak bir farklılığın olmadığı ortaya konuldu. Tavuk serumları kullanılarak yapılan benzer bir çalışma olmadığından dolayı elde edilen bulgular diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmadı. Ancak antijenik yapıların pürifikasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ritter ve ark. (22) *C. jejuni* LPS'lerine karşı hazırlanan serumlarda yaptığı immunoblotting ile *C. jejuni* suşlarında 6,5 , 14,5 , 21,5 , 31 ve 45 kD'lık bantları saptamışlardır. Pei ve ark. (16) *C. jejuni* suşlarının majör antijenik yapılarını ortaya koymak için yaptığı çalışmada 28000 D (PEB1), 29000 D (PEB2), 30000 D (PEB3) ve 31000 D (PEB4) ağırlığında yapıların olduğunu göstermişlerdir. Bu yapıardan PEB1 ve PEB 3'ün insanlarda doğal infeksiyonlarda insan immün sistemi için hedef olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar tavuklarda kolonizasyonda etkili antijenik yapıyı 28000 D'luk proteinle ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmada *C. jejuni* suşlarında 28-31 kD ve *C. coli* suşlarında 29-30 kD'luk antijenik yapıların belirlenmesi diğer araştırmacıların bulguları ile benzerdir. Bu suşların tümünün tavuk bağırsaklarından izole edilmiş olması da, bu antijenik yapının kolonizasyonda etkili olduğunu destekler niteliktedir.

Bu sonuçlar, insan ve hayvanlarda *Campylobacter* 'ösise karşı korunmada aşı geliştirme çalışmalarına temel bilgiler sağlaması bakımından önem

taşımaktadır. Son yıllarda aşılama üzerinde yoğunlaşan çalışmalarda, kanatlı hayvanlarda izole edilen suşlarda temel antijenik yapıların belirlenmesi ve kolonizasyonda

rol oynayan diğer faktörlerin birlikte değerlendirilmesi ile kanatlı hayvanlarda *Campylobacter* kolonizasyonu azaltılabilir.

Kaynaklar

- Diker, K.S.: *Campylobacteriaceae* familyası. Özel Mikrobiyoloji. Arda M (Ed). Medisan Yayınevi, Ankara. 1997; s.125-146.
- Rantala, M., Nurmi, E.: Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by flora of the alimentary tract of chickens. Br. Poultry Sci. 1973; 14: 627-630.
- Humphrey, T.J.: Salmonella, *Campylobacter* and poultry: Possible control measures. Bureau. Hyg. Trop. Dis. 1889; 64: R1-R8.
- Akan, M., Diker, K.S., Yıldırım, M.: Kanatlı *Campylobacter* infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi. TÜBİTAK projesi. VHAG-1234.1998.
- Humphrey, T.J., Henley, A., Lanning, D.G.: The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. Epidemiol. Infect. 1993; 110: 601-607.
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J., Gills, P.: Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J. Clin. Microbiol. 1984; 15: 761-768.
- Annah-Prah, A., Janc, M.: Chicken to human infection with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Biotype and serotype correlation. J. Food Protect. 1988; 51: 562-564.
- Butzler, J.P., Oosterom, J.: *Campylobacter*: Pathogenicity and significance in foods. Int. J. Food Microbiol. 1991; 12: 1-8.
- Taylor, D.E., Chang, N.: Immunoblot and enzyme linked immunosorbent assay of *Campylobacter* major outer-membrane protein and application to the differentiation of *Campylobacter* species. Mol. Cell Probes. 1987; 1: 261-274.
- Vandamme, P., Pot, B., Kersters, K.: Differentiation of *Campylobacters* and *Campylobacter*-like organisms by numerical analysis of one-dimensional electrophoretic protein patterns. Sys. App. Microbiol. 1991; 14: 57-66.
- Costas, M., Pot, B., Vandamme, P., Kersters, K., Owen, R.J.: Interlaboratory comparative study of the numerical analysis of one-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns of *Campylobacter* strains. Electrophoresis. 1990; 11: 467-474.
- Dunn, B.E., Blaser, M.J., Snyder, E.L.: Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter* outer membrane proteins. Infect. Immun. 1987; 55: 1564-1572.
- Guerry, P., Pope, P.M., Burr, D.H., Leifer, J., Joseph, S.W., Bourgeois, A.L.: Development and characterization of recA mutants of *Campylobacter jejuni* for inclusion in attenuated vaccines. Infect. Immun. 1994; 62: 426-432.
- Glünder, G., Spiering, N.: Investigations on parenteral immunisation of chickens with a *Campylobacter* mineral oil vaccine. XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest. 1987; p. 306.
- Ge, Y.F., An, C.B., Jun, T.Y., Sheng, L.X., Tian, W.Z.: Study on the preparation and immuno efficacy of an oil-emulsion inactivated vaccine against chicken vibrio hepatitis. XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest. 1987; p. 322.
- Pei, Z., Ellison, R.T., Blaser, M.J.: Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. J. Biol. Chem. 1991; 266: 16363-16369.
- Harris, N.V., Thompson, D., Martin, D.C., Nolan, C.M.: A survey of *Campylobacter* and other bacterial contaminants of premarket chicken and retail poultry and meats. King Country, Washington. Ame. J. Pub. Health. 1986; 76: 401-406.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R.: Clinical Veterinary Microbiology, London. 1994; pp. 268-272.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheers: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76: 4350-4354.
- Tsang, V.C.W., Peralta, J.M., Simons, A.R.: Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (eitb) for studied the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis methods. Methods Enzymol. 1983; 92: 377-391.
- Ritter, G., Fortunato, S.R., Cohen, L., Noguchi, Y., Bernard, E.M., Stockert, E., Old, L.J.: Induction of antibodies reactive with GM2 ganglioside after immunization with lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni*. Int. J. Cancer. 1996; 66: 184-190.