

Civcivlerin Deneysel *Campylobacter* İnfeksiyonunda Kolonizasyon, Translokasyon ve Antikor Yanıtı*

Hakan YARDIMCI, Jale ERDEĞER, Mehmet AKAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı, Ankara-TÜRKİYE

Murat YILDIRIM

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

Geliş Tarihi: 16.08.2001

Özet: Bu çalışmada, *Campylobacter* lerin civciv bağırsaklarına kolonizasyonunu etkileyen faktörler, kolonizasyon zamanları ve oluşan immun yanıtın belirlenmesi amaçlandı.

Minimal infektif doz₁₀₀ (MID₁₀₀) ile oral yolla infekte edilen civcivlerde, *C. jejuni* ve *C. coli* nin inokulasyonunu takip eden 3 haftada bağırsaklarda kolonizasyonunun %100'e ulaştığı gözlemlendi. İnokule ve izole edilen suşların SDS-PAGE protein profilleri incelendiğinde; *C. jejuni* suşları arasında %98,3 ve *C. coli* suşları arasında ise %98,5 düzeyinde benzerlik belirlendi.

Kan serumları ile yapılan ELISA'da ortalama değerler, *C. jejuni* ile infekte ve kontrol grubunda 2., 3. ve 4. hafta için sırasıyla 0,27-0,25 , 0,22-0,18 ve 0,27-0,17; *C. coli* ile infekte ve kontrol grubunda ise 0,28-0,25 , 0,24-0,19 ve 0,32-0,18 olarak saptandı. İmmunoblot analizi sonrasında, *C. jejuni* suşlarında 61, 47,5 , 29,8 ve 25,6 kDa ve *C. coli* suşlarında ise 62,5 , 48 ve 31 kDa spesifik bantlar belirlendi.

Anahtar Sözcükler: *Campylobacter*, kolonizasyon, seroloji, tavuk, translokasyon

Colonization, Translocation and Antibody Response in Experimental *Campylobacter* Infection of Chickens

Abstract: In this study we examined factors affecting the colonization of *campylobacters* in chick intestines, colonization times and elicited immune responses.

In chicks, infected orally by minimal infective dose₁₀₀ (MID₁₀₀), colonization in the intestines was observed to reach 100% during the 3-week period following *C. jejuni* and *C. coli* inoculation. When the SDS-PAGE protein profiles of the inoculated and isolated strains were examined similarities of 98.3% among *C. jejuni* strains and 98.5% among *C. coli* strains were determined.

The results obtained from the ELISA tests performed with blood sera in the group infected with *C. jejuni* and in the control group for the 2nd, 3rd and 4th weeks were 0.27-0.25, 0.22-0.18 and 0.27-0.17, and the group infected with *C. coli* and the control group were 0.28-0.25, 0.24-0.19 and 0.32-0.18. After the immunoblotting analyses, specific bands that have molecular masses of 61, 47.5, 29.8 and 25.6 kDa were identified from *C. jejuni* strains and 62.5, 48 ve 31 kDa from *C. coli* strains, respectively.

Key Words: *Campylobacter*, colonization, serology, chicken, translocation

Giriş

Termofilik *Campylobacter* türleri, insan ve hayvanlarda enterik infeksiyonların en genel nedenleri arasındadır. Broiler kümeslerde oldukça yaygın olarak bulunan bu etkenler, tavuklarda infeksiyöz hepatitisin de primer etkenidir. İnsanlardaki *Campylobacter*

infeksiyonlarının bulaşmasında, hayvansal orijinli gıdalar ve özellikle kanatlı et ürünleri büyük rol oynamaktadır. Kanatlı hayvanların bağırsaklarında kommensal olarak bulunan diğer termofilik *Campylobacter* türleri *C. coli* ve *C. lari*, *C. jejuni*'ye oranla daha az oranda izole edilmektedir (1,2).

* Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No 96-10-00-19) tarafından desteklenmiştir.

Campylobacter'lerin kanatlı hayvanların bağırsak kanalına kolonizasyonunu etkileyen faktörler ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır (3,4,5). Oral inokulasyon sonrasında, etkenlerin daha çok sekuma, alt jejunuma ve kloakaya kolonize olduğu bildirilmiştir (5). *C. jejuni*'nin flagellası, kolonizasyonu sağlayan önemli bir faktördür. *Campylobacter*'ler kemotaktik uyarımlar sonucunda flagellalarıyla epitel hücrelerine doğru yönelirler ve bakteri tarafından üretilen musinaz, bakterinin sekum ve kloaka kripterine iyi adaptasyonunu sağlar (4,6,7). *C. jejuni*'nin kolonizasyonunda, 69 kD ağırlığındaki antijenik yapının önemi yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur. Bu antijenik yapıyı bulduran suşların, civcivlere kolonize olduğu belirlenirken, kolonizasyon yeteneği olmayan *C. jejuni* suşlarında ise bu spesifik antijenik yapının olmadığı saptanmıştır (8).

Civcivlerde *C. jejuni* kolonizasyonunun genellikle 2-5. haftalarda şekillendiği bildirilmiştir ve dışkı ile çıkarılan *C. jejuni*'lerin broiler piliçlerde yaklaşık 12 hafta, damızlıklarda ise 42 haftaya kadar altlıkta kaldığı saptanmıştır (9). *C. jejuni*'nin 2 günlük-2 haftalık yaşlardaki civcivlerin kolonizasyonu için 10^2 - 10^6 cfu dozu gereklidir (10).

Campylobacter jejuni'nin bulaşması ile ilgili deneysel çalışmalarda, Kazwala ve ark. (11), değişik dozlardaki mikroorganizmayı oral olarak 1 günlük hayvanlara inokule etmişler ve bu hayvanların 24 saat içinde diğer civcivler için infektif dozda mikroorganizmayı dışkıları ile çıkardıklarını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, 3 günlük civcivler, infekte altlık bulunan kümeslere konulmuş ve mikroorganizmaların dışkıda 5. günden sonra izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Horizontal bulaşma ile ilgili bir diğer çalışmada, Shanker ve ark. (12), *C. jejuni* ile kontamine suyu tüketen hayvanların dışkılarından 3. günde izolasyon yapmışlardır.

*Campylobacter*lere karşı serolojik immun yanıtın ölçülmesinde değişik teknikler (komplement fizyasyon, aglutinasyon, indirekt fluoresan antikor, ELISA) kullanılmaktadır (13,14,15). ELISA tekniği fazla miktarda materyali kısa sürede değerlendirmesi ve spesifik olması nedeniyle *Campylobacter* serolojisinde de tercih edilmektedir. Araştırmacılar, sığır, koyun ve tavuk gibi değişik hayvan türlerinde ELISA tekniği kullanarak *Campylobacter*lere karşı oluşan serolojik immun yanıtı belirlemişlerdir (16,17,18). Kanatlı *Campylobacteriosis* ile ilgili çalışmalarda, araştırmacılar kendi laboratuvarlarında hazırladıkları farklı antijenleri ELISA'da kullanmışlardır.

Bu araştırmacılar Myszevski ve Stern (16) asit-glisin ekstrakt (AGE) antijeninden yararlanmışlardır. Çalışmada, deneysel infekte ve infekte edilmemiş piliçlerde, safra ve kanda *Campylobacter jejuni*'ye karşı IgG ve IgA immun yanıtı, peroksidazla işaretli spesifik keçi anti-tavuk IgG ve IgA konjugat ve p-nitrofenilamin substratı kullanılarak araştırılmıştır. Cawthraw ve ark (19) ELISA'da OMP ve asit-glisin antijenlerini kullanmışlardır. Araştırmada oral yolla infekte edilen civcivlerde kan serumu ve sekal yıkıntılarda IgG, IgA ve IgM yanıtı incelenmiştir. Bu çalışmada ayrıca Western blotting tekniği de kullanılmış ve flagellin proteinine karşı spesifik immun yanıt saptanmıştır. Glünder (20) tavuklarda *Campylobacter* türlerine karşı presipite edici antikorların oluşumunu incelediği araştırmada humoral immun yanıtın saptanmasında ELISA tekniğinden yararlanmıştır. Çalışmada formol ile inaktive edilmiş aşı ile sağlanan immun yanıt değerlendirilmiştir. Bakterilerin sonike edilmesinden sonra hazırlanan antijen testlerde kullanılmıştır.

Bu çalışmada, *campylobacter*'lerin civciv bağırsaklarına kolonizasyonunu etkileyen faktörler, kolonizasyon zamanları ve oluşan immun yanıtın belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Deney Hayvanları: Çalışmada minimal infektif doz 10^2 'ün (MID_{100}) belirlenmesinde 50 adet ve denemelerde 150 adet olmak üzere toplam 200 broiler civciv (Ross PM3) kullanıldı. Bu civcivler ticari bir işletmenin kuluçkahanesinden sağlandı.

Bakteri Suşları: Deneysel infeksiyon oluşturmak için kullanılacak tavuk orijinli *C. jejuni* TDJ13 ve *C. coli* TDC2 suşları, araştırma birimi kültür koleksiyonundan sağlandı.

Besiyerleri: İzolasyon ve identifikasyon amacıyla Blood Agar Base No.2 (OXOID) besiyeri, Brucella broth (OXOID), Skirrow Selective Supplement (OXOID) antibiyotik karışımı ve mikroaerobik atmosferin sağlanmasında Gas Generating Kit (OXOID, BR38) kullanıldı.

İnokulum Hazırlanması: Derin dondurucuda (-70 °C) saklanan stok suş çözdürülerek % 5 kanlı agara ekildi ve mikroaerobik koşullarda 37 °C'de 48 saat inkube edildi. Katı besiyerinde bir pasajdan sonra tek koloni Brucella buyyona ekilerek aynı koşullarda 24 saat inkube edildi. Kanlı agarda bakteri sayımı yapıldı ve birim volumdeki

bakteri sayısı spektrofotometrede 530 nm de 10 x 1,5 optik dansite (OD)'ye ayarlandı.

Minimal İnfektif Doz 10^6 'ün Saptanması: Cıvcıvler *C. jejuni* ve *C. coli* için 2 gruba ayrıldı. Gruplardaki cıvcıvlerin *Campylobacter* negatifliği saptandıktan sonra, her grup için hazırlanan inokulumlar 10 katlı sulandırılarak, 5 sulandırmadan 1 haftalık 20'şer cıvcive oral yolla verildi. Her sulandırma grubundaki 4 cıvcivden 2'si inokulasyondan 1 ve diğer 2'si 2 hafta sonra öldürülerek bağırsaklarından Skirrow selektif besiyerine ekim yapıldı.

Deneysel İnfeksiyon Çalışmaları: Yumurtadan çıkartılan 150 cıvciv 1 hafta süreyle gözetim altında tutulduktan sonra 3 eşit gruba ayrıldılar. İki grup *Campylobacter*lerin minimal infektif doz 10^6 'ü ile oral yolla infekte edildiler. İnokulasyondan sonra birer hafta ara ile 4 kez, her hafta 12 cıvciv öldürülerek, kan serumları, karaciğer, safra ve bağırsakları toplandı. İnfekte edilmeyen 3. gruba da aynı işlemler uygulandı.

Bakteriyolojik İncelemeler: Karaciğer, safra ve bağırsaklardan selektif *Campylobacter* besiyerlerine ekim yapıldı. İnkubasyon sonrasında üreyen koloniler morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlandı (21).

Elektroforetik Analiz: İnokule ve izole edilen termofilik *Campylobacter* suşlarının elektroforetik analizi, denatüre koşullarda, kademeli sistemde vertikal slab jel ünitesinde (Hoefer SE-600 vertical slab gel unit) yapıldı (22). Elektroforez işlemlerinde sabit amper/sabit voltaj veren güç kaynağı (Shandon Southern, Vokam) kullanıldı.

Hiperimmunizasyon Antijeninin Hazırlanması: Tavuk orijinli saha suşlarından (*C. jejuni* TDJ13 ve *C. coli* TDC2) immunizasyonda kullanılmak üzere tüm hücre antijeni hazırlandı. İmmunizasyon antijeni için her suş 25'er adet petri kutularındaki Mueller-Hinton agarda üretildi. Koloniler % 0,5'lik formollü PBS ile toplandı ve saflık kontrolleri yapıldı. Süspansiyon % 0,5 formollü PBS ile üç kez yıkandı ve solusyonun yoğunluğu spektrometrede 530 nm'de 10 x 1,5 OD'ye ayarlandı. Bu işlem sonrasında hazırlanan süspansiyon hiperimmunizasyonda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

Hiperimmun serum elde edilmesi: Serolojik testlerde kullanılmak üzere *Campylobacter* yönünden

mikrobiyolojik olarak negatif 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.

ELISA antijeninin hazırlanması: Testte kullanılan antijen Yardımcı ve ark'ın (23) bildirdiği yöntemle göre *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarından asit-glisin ekstraksiyon (AGE) tekniği ile hazırlandı. Bunun için, *Campylobacter* suşları kanlı agarda üretildi, steril distile su ile toplandı ve iki kez yıkandı. Bakteri peletleri 0,2 M glisin-HCl buffer'da (pH: 2,2) 25 ml buffer'a 1 g yaş ağırlık olacak şekilde süspansiyon edildi. Süspansiyonlar karıştırıldı ve +4 °C'de bir gece bekletildi. Antijen ekstraktları 11.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi, supernatantların sodyum hidroksit ile nötralizasyonundan sonra distile suda +4 °C'de 24 saat diyaliz edildiler. Protein konsantrasyonları Lowry (24) metoduna göre saptandı. Ekstraktlar -70 °C'de saklandı.

ELISA tekniği: ELISA tekniği ve reaktifler Voller ve ark'ın (25) bildirdiğine göre ayarlandı. Konjugatın ve antijenlerin optimal dilusyonunu belirlemede satranç tahtası titrasyon yönteminden yararlanıldı. Kan serumu ve bağırsak yıkantıları değerlendirildi. Konjugat olarak peroksidaz enzimi ile işaretli anti-tavuk IgG kullanıldı.

İmmunoblot Analiz: Elektroforez ile ayrılan protein bantları Western immunoblot yöntemi ile nitroselüloz membran üzerine aktarıldı (26,27). Blotting işlemi sırasında Hoefer, TE 70 semiphor semi-dry blotter kullanıldı: Elektroforez sonrası alınan jel transfer buffer içinde yıkandı (Towbin buffer: 0,1920 M glisin, 0,0250 M tris (pH 8,3), 0,0013 M SDS ve % 10 metanol). Elektroforetik transfer sabit akımda (0,8 mA/cm² jel) ve oda ısısında 60 dakikada gerçekleştirildi. Nitroselüloz membran % 5 süttezo içeren PBS-Tween 20 içinde 1 saat bloke edildi. PBS-Tween 20 içinde 3 kez yıkandıktan sonra sulandırılmış test serumu (1/100) ile 1 saat muamele edildi. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı ve nitroselüloz membran anti-tavuk IgG konjugatı (1/1000) ile 1 saat inkube edildi. İnkubasyonu takiben yıkanan bantlar, kolorimetrik reaksiyon görülünceye kadar substrat (3-3 diaminobenzidin) ile muamele edildi. Nitroselüloz membran su ile çalkalanarak reaksiyona son verildi. İmmunoblotting sırasında tüm işlemler oda ısısında gerçekleştirildi.

Bulgular

Minimal İnfektif Doz₁₀₀ (MİD₁₀₀) Değeri: *C. jejuni* ve *C. coli* için 2 gruba ayrılan civcivlere 10 katlı sulandırılan kültürlerden yapılan inokulasyonlar sonucunda MİD₁₀₀ değeri, *C. jejuni* için $3,2 \times 10^6$ bakteri/ml, *C. coli* için $7,6 \times 10^6$ bakteri/ml olarak saptandı. Yapılan deneysel infeksiyon çalışmalarında kolonizasyonun şekillenmesi için en düşük bakteri yoğunluğunun 10^4 bakteri/ml olduğu belirlendi.

Deneysel İnfeksiyon ve İzolasyon Bulguları: MİD₁₀₀ ile oral yolla infekte edilen civcivlerden alınan materyallerden yapılan ekimler sonrasında elde edilen bulgular Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda yapılan izolasyon çalışmalarında 4 hafta süresince incelenen materyallerden termofilik *campylobacter* izolasyonu yapılamadı.

Deneme hayvanlarından alınan organlardan (karaciğer, bağırsak ve safra kesesi) yapılan ekimler sonrasında üreyen koloniler *C. jejuni* ve *C. coli* yönünden değerlendirildi. İzole edilen suşların kültürel, morfolojik, biyokimyasal ve tolerans özellikleri deneysel infeksiyonda kullanılan suşlara tam olarak uygunluk gösterdi.

Elektroforetik Analiz Bulguları: İnokule ve izole edilen suşların SDS-PAGE protein profilleri incelendiğinde; *C. jejuni* suşları arasında % 98,3 ve *C. coli* suşları arasında ise % 98,5 düzeyinde benzerlik belirlendi. Elektroforetik analiz sonrasında, *C. jejuni* suşlarının bant profilleri 10,3 kD ile 118 kD arasında dağılım gösterdi. Tüm *C. jejuni* suşlarında 78,4 , 61 , 47,5 , 53 , 43,5 , 29,8 , 25,6,

18,5 ve 16,5 kD bantları ortak majör bantlar olarak saptandı. *C. coli* suşlarının elektroforetik analizleri sonrasında protein bant profillerinin 10,1 ile 112 kD arasında dağılım gösterdiği ve majör bantların 76,5 , 62,5 , 51,5 , 48, 42 ve 31 kD olduğu gözlemlendi.

Hiperimmün Serum Titresi: Serolojik testlerde kullanılmak üzere tavuklarda hazırlanan hiperimmün serumun titresi tüp aglütinasyon testi ile değerlendirildi ve sonuçta *C. jejuni* için 1:1024 ve *C. coli* için 1:512 olarak belirlendi.

ELISA Bulguları: *C. jejuni* ve *C. coli* ile infekte ve infekte edilmeyen (kontrol grubu) hayvanların kan serumları ve bağırsak yıkantılarının ELISA sonuçları aşağıda sunulmuştur. Bağırsak yıkantıları ile yapılan ELISA denemelerinde, infekte ve infekte edilmeyen gruba ait hayvanlardan alınan materyaller arasında belirgin bir fark saptanamadı. Kan serumları ile yapılan denemelerde ortalama değerler *C. jejuni* ile infekte ve kontrol grubu için 1. hafta OD 0,32 bulundu. Bu değerler infekte ve kontrol grupları için 2., 3. ve 4. hafta için sırasıyla 0,27-0,25 , 0,22-0,18 ve 0,27-0,17 olarak saptandı (Şekil-1). Aynı değerler *C. coli* ile infekte ve kontrol grubu için 1. hafta OD 0,35 bulundu. Bu değerler infekte ve kontrol grupları için 2., 3. ve 4. hafta için sırasıyla 0,28-0,25 , 0,24-0,19 ve 0,32-0,18 olarak saptandı (Şekil-2).

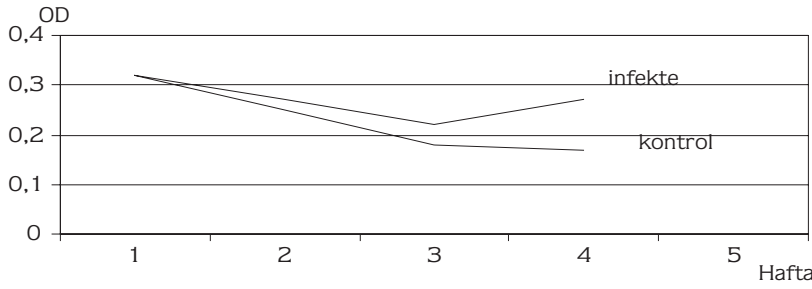
İmmunoblot Analiz Bulguları: İmmunoblot analizi sonrasında, *C. jejuni* suşlarında 61, 47,5, 29,8 ve 25,6 kDa ve *C. coli* suşlarında ise 62,5 , 48 ve 31 kDa'luk spesifik bantlar belirlendi.

Materyal	İzolasyon (%)			
	7. gün (n:12)	14. gün (n:12)	21 gün (n:24)	28. gün (n:36)
Karaciğer	0	2 (16.7)	6 (25.0)	13 (36.1)
Safra	0	2 (16.7)	6 (25.0)	14 (38.9)
Bağırsak	0	0 (0)	5 (20.8)	36 (100)

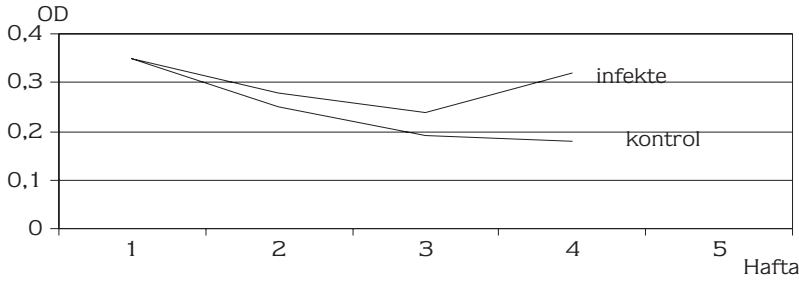
Tablo 1. *C. jejuni* ile infekte edilen civcivlerden elde edilen kümülatif izolasyon sayıları.

Materyal	İzolasyon (%)			
	7. gün (n:12)	14. gün (n:12)	21 gün (n:24)	28. gün (n:36)
Karaciğer	0	1 (8.7)	5 (20.8)	10 (27.8)
Safra	0	1 (8.7)	5 (20.8)	11 (30.6)
Bağırsak	0	0 (0)	6 (25.0)	36 (100)

Tablo 2. *C. coli* ile infekte edilen civcivlerden elde edilen kümülatif izolasyon sayıları.



Şekil 1. *C. jejuni* ile infekte ve kontrol gruplarına ait ortalama OD sonuçları



Şekil 2. *C. coli* ile infekte ve kontrol gruplarına ait ortalama OD sonuçları.

Tartışma

Campylobacter türlerinin zoonotik öneminin ortaya konmasını takiben özellikle kanatlı hayvanlardaki *Campylobacter* infeksiyonları üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. İzolasyon tekniklerinin gelişimine paralel olarak hem kanatlı hayvanların dışkılarında hem de tüketime sunulmuş kanatlı etlerinde yüksek oranda *Campylobacter* izolasyonu bildirilmiştir. Bu çalışmada, temel olarak civcivlerin termofilik *Campylobacter*'lerle erken kolonizasyonunda rol oynayan faktörlerin ve sistemik yayılma yolunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada 200 adet broiler ırkı civciv kullanıldı. MID_{100} değeri, *C. jejuni* için $3,2 \times 10^6$, *C. coli* için $7,6 \times 10^6$ olarak belirlendi. Konu ile ilgili diğer çalışmalarda; Myszewski ve Stern (16), $2,2 \times 10^6/ml$ mikroorganizma inokule ettikleri tüm hayvanlardan *C. jejuni* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Stern ve ark. (28), bir haftalık yaşta civcivlerde kolonizasyon doz₅₀ (KD₅₀) değerini $10^{3,8}$ olarak saptamışlardır. Bu çalışmada *C. jejuni* için belirlenen değerler ile diğer araştırmacıların değerleri benzerdir. Çalışmada *C. coli* için saptanan değerleri, konu ile ilgili başka çalışma olmadığından tartışmak mümkün değildir. Ancak bu çalışmada, *C. coli* için bulunan sonuçlar, *C. jejuni* ile elde edilenlere paraleldir. Kanatlı hayvanlarda *Campylobacter* kolonizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, genellikle bu iki bakteri aynı grupta değerlendirilmektedir (*C. jejuni/C. coli* grup). Bu nedenle

deneysel infeksiyonlarda *C. jejuni* model olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada inokulasyondan önce alınan bir haftalık civcivlerin kan serumlarının tümü *Campylobacter* antikorları yönünden pozitif, olarak saptandı. Bağırsak yıkantıları ile yapılan ELISA da ise örnekler, kontrol grubuna ait değerlere benzer bulundu. Deneysel infeksiyonu takip eden dönemde, *Campylobacter* antikorları iki haftalık dönemde azalırken, 3. haftadan itibaren arttığı belirlendi. Kontrol gruplarında ise, *Campylobacter* antikorlarının belirli bir düzeyde kaldığı gözlemlendi.

Campylobacter antikorlarının saptanmasında ELISA kullanımı, daha çok civcivlerin bu etkenlerle infekte edilmesini takiben oluşan bağırsak mukozasından alınan yıkantılarda IgG, IgA ve IgM'ler araştırılmıştır. Myszewski ve Stern (16), anaçlarında *Campylobacter* infeksiyonu bulunan civcivlerin serumlarında *Campylobacter* spesifik IgG'leri saptamışlar ve iki hafta süre ile kanda kaldığını göstermişlerdir. Ayrıca, bu civcivlerin *C. jejuni* ile infekte edilmesi sonrasında serum antikor düzeyinin hızla düştüğünü de saptamışlardır. Cawthraw ve ark. (19) denemelerinde *C. jejuni* ile infekte ve infekte edilmeyen civcivlerin 9 hafta süre ile kan serumu ve bağırsak yıkantılarındaki antikorları ELISA'da outer membran

proteini (OMP) ve AGE antijeni ile değerlendirmiştir. AGE antijeni kullanarak kan serumu ile yapılan testlerde her iki grupta IgG'ler infekte ve gruplar arasında ilk 2 haftadan sonra farklılık göstermişler, infekte edilenler 7. haftaya kadar belirgin bir artış (infekte edilmeyenin 5 katı) göstermişlerdir. Bağırsak yıkantıları ile yapılan denemede ise ELISA IgG değerlerindeki artış 9. haftaya kadar infekte edilmeyenlerin 10 katına ulaşmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, bağırsak yıkantı sonuçları haricinde diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Günlük civcivlerde ilk gün gerek *C. jejuni* ve gerekse *C. coli* ile infekte edilen gruplarda kan serumundaki IgG düzeyleri en yüksek seviyesindedir. Bu da maternal anti-*Campylobacter* antikorlarının yavruya geçtiğini ancak daha sonra düşmesinin *Campylobacter* kolonizasyonunda etkili olabileceğini göstermektedir. Kontrol gruplarında antikor düzeyinin belirli bir süre sonrasında sabit kalması ise, diğer enterik bakterilerden kaynaklanan kros reaktif antikorlarla açıklanabilir. Ancak çalışmada IgA konjugatı kullanılmaması nedeniyle bağırsaklardaki mukozal bağışıklık ile ilgili yeterli veri sağlanamamıştır. Nitekim bağırsak yıkantılarından IgG konjugatı ile yapılan ELISA çalışmalarında, kontrol ve deneme hayvanları arasında belirgin bir farkın bulunamaması, Cawthraw ve ark.'nın (19) sonuçları ile karşılaştırıldığında kolonizasyonda IgG'lerin rolünün zayıf olabileceği, kontrol grubundaki kros reaksiyonların bu araştırmacılara göre fazlalığı ve deneme süresinin kısalığı ile açıklanabilir. Ayrıca çalışmadaki hayvanların 5 hafta süre ile denemeye alınmış olması da sonuçların bu araştırma sonucu ile net olarak değerlendirilmesini engellemektedir.

Bu çalışmada *C. jejuni* inokulasyonunu takip eden bir hafta sonra yapılan ekimlerde karaciğer, safra ve bağırsaklardan izolasyon düşük oranda yapıldı. İkinci ekimlerde ise, bu oranlarda artış saptandı. İnokulasyonu takiben bağırsaklardaki izolasyon oranının % 100'e ulaştığı gözlemlendi. Bu süre sonunda ise safrada % 39 ve karaciğerde % 37 oranında izolasyon gerçekleştirildi. *C. coli* ile infekte edilen gruplarda izolasyon oranları *C. jejuni*'ye benzerlik gösterdi. Bu sonuçlar, termofilik *campylobacter*'lerde oral yolla etkenlerin alınmasını takip eden süreçte, öncelikle safra ve karaciğere kolonize olduğunu ve daha sonra bağırsaklarda kolonizasyonun gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bağırsaklarda kolonizasyonun şekillenmesinin yüksek oranda olması bu sistemde *campylobacter*'lerin eliminasyonunu önleyici

mekanizmaların yeterli olmadığı, diğer organlarda ise kolonizasyonun şekillenmesinden sonra oluşan immün yanıtın, bakteri kolonizasyonunu sınırlandırdığını da göstermektedir.

Stern ve ark. (29), spesifik antikorların *C. jejuni*'nin kolonizasyonunu engellediğini deneysel olarak göstermişlerdir. Bu çalışmada kan serumları ile elde edilen sonuçlar araştırmacıların bulguları ile uyumludur. Bu sonuçlara göre *campylobacter*'lerin civcivlere kolonizasyonunun 2. haftadan sonra görülmesi serumdaki spesifik antikorlar ile açıklanabilir. Ancak diğer bazı çalışmalarda, *C. jejuni* ile birinci günde infekte edilen civcivlerin etkene karşı mukozal immün yanıt (IgA ve IgG) oluşturdukları bildirilmiştir (16,19,20). Çalışmada sadece civcivlerin serumları ve bağırsak yıkantıları IgG antikorlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Bağırsak yıkantılarında IgA ve safrada antikor aranmamıştır. Araştırmacıların bulguları, bu çalışmada elde edilen bulgulara ve bilinen *Campylobacter* kolonizasyon şekline terstir. Çünkü eğer infeksiyon mukozal antikor yanıtını uyarıyorsa bunların *Campylobacter* kolonizasyonunu önlemesi gerekir. Ancak doğal koşullarda da salgısal antikorların kolonizasyonu önlemediği % 100'e varan izolasyon oranlarından anlaşılmaktadır. Bu durumda akla gelen en mantıklı açıklama bilinmeyen nedenlerle anti-*campylobacter* antikorlarının etkenleri nötralize edememesidir.

Kazwala ve Collins (30), termofilik *campylobacter*'lerin bağırsaklarda kolonizasyon zamanlarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, ilk *campylobacter* izolasyonunun 8-14. günler arasında değiştiğini ve 28. günden sonra oranın % 96 düzeyine ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, altlık, suluk ve yemliklerden 1-14. günlerde izolasyon yapamamışlar ve ancak 15-21. günlerdeki dönemde bu materyallerden izolasyon yapmışlardır. Bu materyallerde 28. günden sonra % 12.3 oranında izolasyon gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar aldıkları su numunelerinde ve bakıcı çizmelerinde 1-7. günlerden itibaren izolasyon yapmışlar ve 28. günden sonra sudan izolasyon oranı % 53'e, çizmelerden izolasyon oranı % 100'e ulaşmıştır. Araştırmacılar bu bulgulara dayanarak, bulaşma kaynaklarının bakıcı çizmeleri, giysileri ve su olduğunu ileri sürmüşlerdir. Humphrey ve ark. (31) inceledikleri broiler kümeslerinin % 76'sında *C. jejuni* kolonizasyonu saptamışlardır. Jacobs-Reitsma ve ark. (32) inceledikleri iki kümeden aldıkları örneklerde *Campylobacter*

kolonizasyonunu % 100 olarak saptamışlardır. Jacobs-Reitsma (33), incelediği 43 damızlık kümesinin 43'ünden *Campylobacter* spp. izolasyonu yapmış ve bu kümeslerde izolasyon oranlarının % 20 ile % 100 arasında değiştiğini bildirmiştir. Ayrıca araştırmacı, 5 kümeste materyallerin 5 gün gecikme sonrasında kültüre edildiğini ve bu kümeslerde izolasyon oranının % 20-% 55 arasında değiştiğini bildirmiştir. Çalışmada elde edilen izolasyon zaman ve oranları ile araştırmacıların bulguları arasında benzerlik bulunmaktadır.

Deneysel enfeksiyonda kullanılan *C. jejuni* ve *C. coli* suşları ile birer haftalık aralarla karaciğer, safra ve bağırsaktan izole edilen *C. jejuni* ve *C. coli* suşlarının elektroforetik protein profilleri arasında büyük bir benzerlik olması, enfeksiyonun aynı suşla oluştuğunu göstermektedir. Konu ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmaya rastlanmadığından bu çalışmada elde edilen

bulguları tartışmak mümkün olmadı. Fakat genel olarak termofilik *Campylobacter*lerin bulaşmasında belirli bir kontaminasyon kaynağının olması ve sürü kolonizasyonun aynı suştan kaynaklandığını bildiren araştırmacıların bulguları bu sonucu destekler niteliktedir (12,30,34,).

İmmunblot analizinde *C. jejuni* suşlarında 61, 47,5, 29,8 ve 25,6 kDa ve *C. coli* suşlarında ise 62,5 , 48 ve 31 kDa spesifik IgG yanıtı belirlendi. Bu bantlar serumda deneysel enfeksiyonu takip eden 3. haftada gözlemlendi. Benzer bir çalışmada, Cawthraw ve ark. (19), enfeksiyonu takip eden 2. haftada 69, 62 ve 47 kDa spesifik IgG yanıtı belirlemiş ve bu bantlardan 62 kDa'nın flagelline karşı oluştuğunu bildirmiştir. Araştırmacının bulguları ile bu çalışmanın bulguları uyumludur. Bu çalışmada 61 kDa bant flagelline karşı oluşmuş IgG yanıtı olarak kabul edilebilir.

Kaynaklar

1. Diker, K.S.: *Campylobacteriaceae* familyası. Özel Mikrobiyoloji, ARDA, M. (Ed)., Medisan Yayınevi, Ankara. 1997; s. 125.
2. Griffiths, P.L., Park, R.W.A.: *Campylobacter* associated with human diarrhoeal disease. J. Appl. Microbiol. 1990; 69: 281-301.
3. Doyle, M.P.: Association of *Campylobacter* *Jejuni* with laying hens and eggs. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 47: 533-536.
4. Newell, D.G., McBride, H., Dolby, J.M.: Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. J. Hyg. 1985; 95: 217-227.
5. Beery, J.T., Hugdahl, B., Doyle, M.P.: Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54: 2365-2370.
6. McSweeney, E., Walker, R.I.: Adherence of *Campylobacter jejuni* to INT 407 intestinal cells, in: Pearson, A.D., Skirrow, M.B., Lior, H., Rowe, B. (Eds). *Campylobacter* III, London. 1985; p.135.
7. Hugdahl, M.B., Beery, J.T., Doyle, M.P.: Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 1988; 56: 1560-1566.
8. Meinersmann, R.J., Stern, N.J., Blankenship, L.C.: Antigenic difference in congenic chicken-colonizing and noncolonizing strains of *Campylobacter jejuni*. Curr. Microbiol. 1990; 21: 17-21.
9. Linblom, G.B., Sjögren, E., Kaijser, B.: Natural *Campylobacter* colonization in chickens raised under different environmental conditions. J. Hyg. Camb. 1986; 96: 385-391.
10. Shanker, S., Lee, A., Sorrell, T.C.: Experimental colonization of broiler chicks with *Campylobacter jejuni*. Epidemiol. Infect. 1988; 100: 27-34.
11. Kazwala, R.R., Collins, J.D., Hannan, J.: The establishment and spread of experimental *Campylobacter jejuni* infections in young chickens. Prev. Vet. Med. 1992; 13: 19-26.
12. Shanker, S., Lee, A., Sorrell, T.C.: Horizontal transmission of *Campylobacter jejuni* amongst broiler chicks: experimental studies. Epidemiol. Infect. 1990; 104: 101-110.
13. Garcia, M.M., Eaglesome, M.D., Rigby, C.: *Campylobacters* important in veterinary medicine. Vet. Bull. 1983; 53: 793-818.
14. Diker, K.S.: Koyun ve sığırlardan izole edilen *Campylobacter* türlerinin identifikasyonu üzerinde çalışmaları Doğa Bilim Der. D1. 1985; 9: 232-240.
15. Firehammer, B.D., Border, M.B.: Bulk growth procedure and a button agglutination test for *Campylobacter*, Am. J. Vet. Res. 1986; 47: 1415-1418.
16. Myszewski, M.A., Stern, N.J.: Influence of *Campylobacter jejuni* cecal colonization in immunoglobulin response in chickens. Avian Dis. 1990; 34: 588-594.
17. Hum, S., Stephens, L.R., Quinn, C.: Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*, Aust. Vet. J. 1991; 68: 272-275.
18. Yardımçı, H., Diker, K.S., Akan, M.: Use of ELISA for detection of *Campylobacter* antibodies in sheep. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 1994; 18: 129-133.
19. Cawthraw, S., Ayling, R., Nuijten, P., Wassenaar, T., Newell, D.G.: Isotype, specificity, and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* antigens, including flagellin, during experimental oral infections of chickens. Avian Dis. 1994; 38: 341-349.

20. Glünder, G.: Entwicklung humoraler präzipitierender antikörper gegen *Campylobacter* spp. beim huhn., J. Vet. Med. B. 1995; 42: 89-99.
21. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R.: Clinical Veterinary Microbiology, London. 1994; pp: 268-272.
22. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 1970; 227: 680-685.
23. Yardımcı, H., Diker, K.S., Akan, M.: Use of ELISA for detection of *Campylobacter* antibodies in sheep. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 1993; 18: 129-133.
24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurements with folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
25. Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A.: The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), London, Dynatech Europe Borough. 1979.
26. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76: 4350-4354.
27. 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.
28. Stern, N., Shanker, R., Pearson, A., Fairbrother, J.: *Campylobacter* in poultry. VIth International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related Organisms, Sydney, Australia. 1991.
29. Stern, N.J., Meinersmann, R.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Blankenship, L.C.: Influence of host lineage on cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens. Avian Dis. 1990; 34: 602-606.
30. Kazwala, R.R., Collins, J.D.: *Campylobacter jejuni* infection in commercial poultry meat production: factors responsible for establishment and spread. World. Assoc. Vet. Food. Hyg. Xth Int. Symp. Stockholm. 2-7 July, Stockholm. 1989.
31. 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.
32. Jacobs-Reitsma, W.F., van de Giessen, A.W., Bolder, N.M., Mulder, R.W.A.W.: Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch Broiler Farms. Epidemiol. Infect. 1995; 114: 413-421.
33. Jacobs-Reitsma, W.F.: *Campylobacter* bacteria in breeder flocks. Avian.Dis. 1995; 39: 355-359.
34. Rollins, D.M., Colwell, R.R., Pearson, A.D.: Non-culturable *campylobacters* in the enviroment: detection by indirect fluourescent antibody technique. 1987; in: Kaijser, B., Falsen, E. (Eds) *Campylobacter* IV, Sweden. 1987; pp. 285-291.