

Van Çevresindeki Koyunlarda *Campylobacter* Antikorlarının ELISA ile Saptanması

Hakan YARDIMCI¹ Banur BOYNUKARA² Mehmet AKAN¹ K. Serdar DİKER¹

¹ Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı - ANKARA

² Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı - VAN

ÖZET

Bu çalışmada, Van çevresindeki koyunlarda *Campylobacter* 'lere karşı oluşan sınıf spesifik antikorları (IgG) belirlemek için ELISA kullanıldı. ELISA yöntemi pozitif ve negatif kontrol serumları ve peroksidaz işaretli tavşan anti-koyun IgG konjugatı kullanılarak, satranç tahtası titrasyon yöntemi ile standardize edildi. Testlerde *C. fetus* subsp. *fetus* ve *C. jejuni* 'den hazırlanan asit-glisin ekstrakt (AGE) antijenlerinden yararlanıldı. Van çevresindeki atık yapmış koyunlardan toplanan 210 serum *Campylobacter* antikorları yönünden, *C. fetus* subsp. *fetus* ve *C. jejuni* AGE antijeni kullanılarak ELISA ile incelendi. Atık yapmış koyunlardan toplanan serumların % 39'u *C. fetus* subsp. *fetus* ve % 34.3'ü *C. jejuni* antijeni ile ELISA'da pozitif bulundu. İstatistiksel değerlendirmede iki antijene ait sonuçlar arasındaki farkın önemsiz olduğu saptandı ($p>0.05$). Sonuç olarak, Van çevresinde koyun campylobacteriosisinin serolojik tanısında ELISA'nın tarama testi olarak kullanılacağı ve testte elde edilen saha sonuçlarının enfeksiyonun karakterine uygun olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: *Campylobacter*, Koyun, Abortus, ELISA, Van

Use of ELISA for Detection of *Campylobacter* Antibodies in Sheep in District of Van

SUMMARY

In this study, an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) was adapted to detect class specific immunoglobulin (IgG) against *Campylobacter* in sheep in district of Van. In checkerboard titration, acid-glycine extract (AGE) antigens of *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. jejuni* were compared by using positive and negative control sera peroxidase labelled rabbit anti-sheep IgG in ELISA. The serum samples collected from 210 aborting ewes were examined for *Campylobacter* antibodies using AGE antigen of *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. jejuni* in ELISA. It was found that there is not any significant difference ($p>0.05$) between ELISA results of *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. jejuni* antigens, statistically. In test, 39 % and 34.3 % of aborting ewes were found to be seropositive by antigens of *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. jejuni*, respectively. It was concluded that ELISA can be used (as a screening test) in the diagnosis of ovine campylobacteriosis in district of Van and, field results of ELISA show that it was convenient to character of ovine campylobacteriosis.

Key Words : *Campylobacter*, Sheep, Abortion, ELISA, Van

GİRİŞ

Campylobacteriosis, koyunların oldukça bulaşıcı ve ekonomik olarak önemli bir hastalığıdır (5,9). Koyunların campylobacteriosis vakalarından *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. jejuni* ve *C. coli* izole edilmiştir (5,6,7,9,27). Koyun campylobacteriosis'i abort, prematüre ve/veya zayıf kuzu doğumları ile karakterizedir (3,6,7). Bulaşma mekanizması, sindirim kanalından alınan etkenlerin bakteriyemi aşamasından sonra uterusu yerleşmesi ile açıklanmaktadır (9,13). Koyunlar epizootik periyotta abort yapmasalar da doğal enfeksiyonlarda antikor yanıtı meydana geldiği bildirilmektedir (9,10).

Değişik araştırmacılar campylobacteriosis'in serolojik tanısında aglutinasyon, komplement fikzasyon, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), indirek fluoressan antikor ve serum bakterisidal testlerini kullanmışlardır (4,8,9). Bu testlerin birçoğu düşük sensitivite veya spesifite ve sınıf spesifik antikorları saptayamama gibi olumsuzluklar gösterebilmektedirler. Son yıllarda, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) insanlarda (1,14) sığırlarda (15,16), koyunlarda (10,31) ve tavuklarda (22) *C.jejuni* ve *C. fetus* antikorlarının saptanmasında kullanılmaktadır. Araştırmalarda ELISA'nın yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip ve diğer testlere göre

daha üstün olduğu ortaya konulmuştur (1,14,15,16). Koyun campylobacteriosis'inin ELISA ile tanısına ilişkin az sayıda saha çalışması bulunmaktadır (10,31). Bu çalışmanın amacı, Van çevresinde abort yapan koyunlarda campylobacter antikorlarının iki farklı antijen kullanarak ELISA tekniği ile belirlenmesi ve test sonuçlarının karşılaştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Bakteri suşları: ELISA antijeninin hazırlanmasında kullanılan, aborte koyun fetuslarından izole edilmiş, *C. fetus* subsp. *fetus* CF2 ve *C. jejuni* AF3 suşları, A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlandı.

Bakteriler % 7 defibrine koyun kanlı Blood Agar base No.2 (Oxoid) de 37°C de 48-72 saatte üretildi.

Kontrol serumları: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Veteriner Merkez Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan, abort yapmış (komplement fikzasyon testi-CFT pozitif) ve sağlıklı (CFT negatif) koyunlara ait pozitif ve negatif serumlar ELISA'da kontrol serumu olarak kullanıldı.

Saha Serumları : Van çevresindeki campylobacter aşısı yapılmamış, 7 farklı sürüden toplanan, atık yapmış koyunlara ait ve serolojik olarak (tüp aglutinasyon testlerinde titre vermeyen ve lam aglutinasyon testi negatif) Salmonella abortus ovis ve Brucella negatif 210 serum ELISA ile campylobacter antikorları yönünden incelendi.

ELISA Antijenlerinin Hazırlanması : Testte kullanılan antijen Yardımcı ve ark.'nın (31) bildirdiği yöntemle göre C. fetus subsp. fetus CF2 ve C. jejuni AF3 suşlarından Asit-glisin ekstraksiyonu (AGE) tekniği ile hazırlandı. Bunun için, campylobacter suşları kanlı agarda üretildi, steril distile su ile toplandı ve iki kez yıkandı. Bakteri peletleri 0.2M glicin-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 metoduna göre saptandı (20). Ekstraktlar -70 °C'de saklandı.

ELISA Tekniği: ELISA tekniği Voller ve ark.'nın (28) bildirdiğine göre uygulandı. Konjugatın ve antijenlerin optimal dilusyonunu belirlemede satranç tahtası titrasyon yönteminden yararlanıldı. Testte, antijenlerin absorpsiyonu için katı faz olarak düz tabanlı polystyrene microtiter plate'ler (Greiner) kullanıldı. Antijenler 0.5 M karbonat buffer'da (pH 9.6) sulandırıldı ve her göze 50 µl konuldu. Plate'ler +4 °C'de bir gece inkube edildi, PBS+Tween (PBS, pH: 7.4, %0.05 Tween20) ile yıkandı ve kurutuldu. Serumlar PBS+Tween'de 1:10 sulandırıldı ve her göze 50 µl eklendi. Plate'ler 37 °C'de 1 saat bekletildi ve sonra yıkandı. Titrasi saptanan peroksidaz işaretli tavşan anti-koyun konjugatı'nın (Sigma) 50 µl'si gözlelere ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkube edildi. Yıkama işleminden sonra, 100 µl substrat [(40 mg ortho-phenylenediamine+100 ml fosfat-sitrat buffer, pH:5.0)+(40 µl %30 H₂O₂)] her göze damlatıldı. Plate'ler oda ısısında 10 dakika bekletildi ve reaksiyon gözlelere 50 µl 1.25 M H₂SO₄ eklenerek durduruldu. Optik dansite (OD) değerleri mikro ELISA okuyucusu (Metertech Σ960) ile 490 nm de saptandı. Her örnek iki kez test edildi ve duplike örneklerin ortalama absorbansları sonuç olarak değerlendirildi. Absorbans değerlerini pozitif veya negatif olarak değerlendirebilmek için her plate'de 8 pozitif 8 negatif kontrol serumu bulundu. OD değeri 0 plate'deki negatif ortalamanın en az 3 standart sapma üstünde olan örnekler pozitif kabul edildi.

İstatistiksel Değerlendirme: İstatistiksel değerlendirme SPSS for MS WINDOWS Release 5.0 bilgisayar programı ile yapıldı.

BULGULAR

ELISA Standardizasyon Sonuçları: Satranç tahtası yöntemi ile yapılan değerlendirmede optimal konjugat dilusyonu her iki antijen için 1:10.000 olarak saptandı. C. fetus subsp. fetus ve C. jejuni antijenlerinin protein içerikleri dikkate alınarak yapılan sulandırmalarda antijenlerin her ikisinin de 1:100 de en iyi pozitif ve negatif farkını verdiği saptandı. Bu sonuca göre antijenlerin testlerde kullanılan optimal protein miktarları her ikisi için 3 µg/ml olarak belirlendi.

Saha Serumları ELISA Sonuçları : Testler sonucu toplam 210 serumda C. fetus subsp. fetus antijeni ile 82 (% 39) pozitif ve 128 (% 61) negatif, C. jejuni antijeni ile 72 (%

34.3) pozitif ve 138 (% 65.7) negatif serum saptandı (Tablo 1). Her iki antijen ile 43 serum (%20.5) pozitif ve 99 serum (%47.1) negatif reaksiyon verdi. İncelenen serum örneklerinden 39 (% 18.6)'u C. fetus subsp.fetus pozitif ve C. jejuni negatif; 29 (% 13.8)'u ise C. fetus subsp. fetus negatif ve C. jejuni pozitif olarak belirlendi (Tablo 2).

Tablo1.Campylobacter antijenleri ile elde edilen ELISA sonuçları

Antijen	Pozitif (%)	Negatif (%)
C. fetus subsp. fetus	82 (39)	128 (61)
C. jejuni	72 (34.3)	138 (65.7)

Tablo 2. Karşılaştırmalı ELISA sonuçları

Antijen	C. jejuni	
	Pozitif(%)	Negatif (%)
C. fetus subsp. Fetus	43 (20.5)	39 (18.6)
	29 (13.8)	99 (47.1)

İstatistiksel Değerlendirme : SPSS for MS WINDOWS Release 5.0 bilgisayar programı ile yapılan Wilcoxon önemlilik testinde (p >0.05) iki farklı antijen ile yapılan ELISA sonuçları arasındaki fark bağımlı iki grubun karşılaştırılmasında önemsiz bulundu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye'de koyunlarda campylobacter antikorlarının dağılımı ile ilgili serolojik testlerle yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Özellikle, koyun yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı doğu illerinde koyun campylobacteriosis varlığını ortaya koyacak nitelikte bir serosurvey yapılmamıştır. Van ili çevresinde abort vakaları ile ilgili olarak yapılan serolojik çalışmalarda, Brucella ve Salmonella abortus ovis'e karşı antikorlar değişik testlerle aranmıştır (2,11,12).Campylobacteriosis serolojik varlığını belirlemek için spesifik, sensitiv ve pratik metodlara gereksinim vardır. Günümüzde campylobacteriosis serolojik tanısında kullanılan aglutinasyon ve komplement fikzasyon testleri tarama testi olarak pratiğe uygun değildir (9,17,30). Nitekim, campylobacter infeksiyonlarında, semptomların gebeliğin yalnız son döneminde görülmesi ELISA gibi bir tarama testinin infeksiyon odaklarını ortaya koymada oldukça faydalı olacağını göstermektedir. Enzyme-immunoassay'ler hayvanların birçok bakteriyel infeksiyonunun tanısında fazlaca kullanılıyorsa da, koyun campylobacteriosis ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Koyunların campylobacter infeksiyonlarında yalnız iki çalışmada ELISA, tarama testi olarak doğal infekte ve aşıtlı hayvanların tanısında kullanılmıştır (10,31).

ELISA'nın spesifitesi büyük ölçüde uygun antijen seçimine bağlıdır. Değişik araştırmacılar, campylobacter ELISA'da tam hücre, asit-alkali ekstrakt, fenol-su ekstrakt, sonikasyon ve ısı ile muamele edilmiş antijenlerden yararlanmışlardır (1,10,23,24,25,29). C. fetus subsp. fetus'un asit glisin ekstrakt antijeni ilk olarak McCoy ve ark. (21) tarafından bildirilmiştir. Logan ve Trust (19), C. jejuni asit glisin ekstraktlarının kompozisyonunu analiz ettiklerinde yapısının proteinlerin karışımından meydana geldiğini saptamışlardır.

Bunların içerisinde flagellar ve yüzey proteinleri olduğunu belirlemişlerdir. Her ikisinin de suşlar arasında kros reaksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Asit glisin muamelesi daha fazla antijenik materyali etkileyerek bunları açığa çıkarabilmektedir. Yardımcı ve ark. (31) yaptıkları çalışmada AGE antijeninin saha serumlarının taranmasında tam hücre ve sonike antijene göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, iki farklı *Campylobacter* türünün (*C. fetus* subsp. *fetus* ve *C. jejuni*) AGE antijenleri standardize edildikten sonra saha taramasında kullanıldı. Ayrıca, saha serumları, diğer çalışmalardan (10,31) farklı olarak iki antijen ile değerlendirildi.

Yardımcı ve ark.'nın (31) yaptıkları çalışmada, *C. fetus* subsp. *fetus* ve *C. jejuni* antijenleri ile elde edilen ELISA sonuçları paralellik göstermiştir. *C. jejuni* antijeni ile değerlendirilen pozitif kontrol serumlarının ortalama titreleri yaklaşık olarak *C. fetus* subsp. *fetus* antijeni ile değerlendirilenlerden 3 kat daha düşüktür. *C. jejuni* antijeni tüm pozitif serumları saptayabilmiştir. Araştırmacılar, bu sonuca göre *C. fetus* subsp. *fetus* ve *C. jejuni* suşlarının ELISA'da birbirini ile reaksiyon veren bazı ortak AGE antijenleri olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna karşın, Rautelin ve ark. (26) ELISA'da *C. fetus* subsp. *fetus* ve *C. jejuni* AGE antijenlerinin kros reaksiyon vermediğini ve diagnostik *Campylobacter* serolojisinin birden çok suş için geliştirilmesi gerektiğini bildirmektedirler. Bu çalışmada *C. fetus* subsp. *fetus* ve *C. jejuni* AGE antijenleri tüm saha serumlarında denendi. İki değişik antijenle elde edilen saha sonuçları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Ancak, pozitifleri belirlemede *C. fetus* subsp. *fetus* antijeni ile *C. jejuni*'ye göre daha fazla pozitif saptandı. Bu da Yardımcı ve ark. (31)'in hem *C. fetus* subsp. *fetus* ve hem de *C. jejuni* suşlarının sahada koyunlarda *campylobacteriosis* nedeni olduğunu ve antikorlarının tek bir suş antijeni ile saptanabileceği görüşünü destekler niteliktedir.

Campylobacter için pozitif bir serolojik test sonucu, aşılı (10,18), infekte (9,10) veya abortif infeksiyon (4) durumlarından birisini göstermektedir. Örneklerin toplandığı sırada Van çevresinde koyun *campylobacteriosis*ine karşı aşı uygulaması olmadığından pozitif ELISA sonuçları abortif veya latent *campylobacter* infeksiyonunu ortaya koymaktadır. Diker (4), abort yapan koyun serumlarının % 34'ünün *campylobacter* pozitif olduğunu bildirmiştir. Yardımcı ve ark. (31) atık yapmış koyunlardan toplanan serumların % 33,4'ünü ELISA ile pozitif bulmuşlardır. Bu bulgular koyunlarda abortla seyreden *campylobacter* infeksiyonu prevalansının relatif olarak stabil olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da bu stabil durumu destekler niteliktedir. Nitekim *C. fetus* subsp. *fetus* antijeni ile % 39 ve *C. jejuni* antijeni ile % 34,3 pozitif belirlenmiştir. Ayrıca, Van çevresinde koyun *campylobacteriosis*i ile ilgili seroepidemiolojik çalışmalarda ELISA'nın tarama testi olarak yararlı olacağı da anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1-Blaser M.J., Duncan D.J. (1984): Human Serum Antibody Response to *Campylobacter jejuni* as Measured in an Enzyme Linked Immunosorbent Assay, *Infect. Immun.*, 44: 292-8.

2-Boynukara B., Akgül Y., Gürtürk K., İçen H., Aksakal A., Sancak Y.C., Gülyüz F. (1995): Van ve yöresinde yavru atan koyunların kan serumlarında *Salmonella abortus ovis* antikorlarının aranması. *Y.Y.Ü. Sađl. Bil. Derg.*, 1: 54-57.

3-Cawthraw S., Ayling R., Nuijten P., Wassenaar T., Newell D.G. (1994): Isotype, Specificity, and Kinetics of Systemic and Mucosal Antibodies to *Campylobacter jejuni* Antigens, Including Flagellin, During Experimental Oral Infections of Chickens. *Avian Disease*, 38: 341-349.

4-Diker K. S. (1985): Koyun ve Sığırlardan İzole Edilen *Campylobacter* Türlerinin İdentifikasyonu Üzerinde Çalışmalar. *Dođa Bilim Derg.* D1, 9: 232-240.

5-Diker K. S., İstanbulluođlu E. (1988): Ovine Abortion Associated with *Campylobacter jejuni*. *Vet. Rec.*, 118: 307.

6-Diker K. S., Sahal M., Aydın N. (1988): Ovine Abortion Associated with *Campylobacter coli*. *Vet. Rec.*, 122: 87.

7-Diker K. S. (1984): Çeşitli Hayvanlardan İzole Edilen *Campylobacter* Türlerinin Biyokimyasal ve Serolojik Özellikleri Üzerinde Çalışmalar. Doktora Tezi, Ankara.

8-Firehammer B. D., Border M. B. (1986): Bulk Growth Procedure and A Button Agglutination Test for *Campylobacter*. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 1415-1418.

9-García M. M., Eaglesome M.D., Rigby C. (1983): *Campylobacters* Important in Veterinary Medicine. *Vet. Bull.*, 53: 793-818.

10-Gröhn K., Genigeorgis C. (1985): Adaptation of ELISA for Detection of *Campylobacter* Antibodies and Its Application in Seroepidemiological Studies in Sheep and Cattle Herds. *Acta Vet. Scand.*, 26:30-48.

11-Gürtürk K., Boynukara B., Aksakal A. (1996): Immunoblotting analysis of immunoglobulin G antibody response against cytosoluble antigens of *Brucella melitensis* strain Rev 1 in naturally infected sheep. *Y.Y.Ü. Sađl. Bil. Derg.*, 2:12-16.

12-Gürtürk K., Alan M., Boynukara B., Solmaz H. (1994): Van ve yöresinde koyun ve sığır brucellosis'inin insidensi üzerine araştırmalar. *Y.Y.Ü. Vet.Fak.Derg.*, 5:121-125.

13-Hedstrom O. R., Sonn R. J., Lassen E. D., Hultgren B. D., Crisman R. O., Smith B. B., Snyder S. P. (1987): Pathology of *Campylobacter jejuni* Abortion in Sheep. *Vet. Pathol.*, 24: 419-426.

14-Herbrink P., Munckhof H.A.M., Burnkens M., Lindeman J., Dijk W.C. (1988): Human Serum Antibody Response in *Campylobacter jejuni* Enteritis as Measured by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7: 388-393.

15-Hewson P.L., Lander K.P., Gill K.P.W. (1985): Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Antibodies to *Campylobacter fetus* in Bovine Vaginal Mucus. *Res. Vet. Sci.*, 38: 41-45.

16-Hum S., Stephens L.R., Quinn C. (1991): Diagnosis by ELISA of Bovine Abortion due to *Campylobacter fetus*. *Aust. Vet. J.*, 68: 272-275.

17-Jones D.M., Robinson D.A., Eldrige J.(1981): Serological Studies in Two Outbreaks of *Campylobacter jejuni* Infection. *J. Hyg.*, 87: 163-170.

18-Keisler D.H., Burke V., Copelin J., Lane B., Starbuck M., Behymer D. (1989): A serologic Survey in

Ewes Treated with One of Two Chlamydia / Campylobacter Vaccines. Small Ruminant Res., 2: 345-358.

19-Logan S.M., Trust T.J. (1983): Molecular Identification of Surface Protein Antigens of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun., 42: 675-682.

20-Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.(1951):Protein Measurements with Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

21-McCoy E.C., Doyle D., Burda D., Corbeil L.B., Winter A.J. (1975): Superficial Antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: Characterization of an Antiphagocytic Component. Infect. Immun., 11: 517-525.

22-Myszewski M.A., Stern N.J. (1990): Influence of *Campylobacter jejuni* Cecal Colonization in Immunglobulin Response in Chickens. Avian Disease. 34: 588-594.

23-Naess V., Hofstad T. (1987): Antigenicity of Lypopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in passive Haemagglutination Tests and Enzyme Linked Immunosorbent Assays. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B., 95:108-118.

24-Oosterom J., Denuyl C.H., Banffer J.R.J., Lauwers S., Huisman J., Busschbach A.E., Poelma F.G.J. (1985): Evaluation of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of *Campylobacter jejuni* Antibodies, and Comparison with A Complement Fixation Test (CFT). Antonie Von Leeuwenhoek, 51: 321-331.

25-Rautelin H. (1987): Acid and Alkaline Campylobacter Extracts in the Demonstration of Antibody Response in Hyperimmunized Rabbits. Acta Pathol. Micro-biol. Immunol. Scand., Sect. B, 95: 108-118.

26-Rautelin H., Kosunen T.U. (1987): Single and Multiple Acid Extract Antigens in Campylobacter Serology. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, 95: 277-281.

27-Varga J., Mezes B., Fodor L., Hajtos I. (1990): Serogroups of *Campylobacter fetus* and *Campylobacter jejuni* Isolated in Cases of Ovine Abortion. J. Vet.Med.B,37:148-152.

28-Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. (1979): The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), London, Dynatech Europe Borough..

29-Walder M., Forsgren A. (1982): Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Antibodies Against *Campylobacter jejuni*, and Its Clinical Application. Acta Pathol. Microbiol. Immunol., Scand. Sect. B., 90: 423-433.

30-Watson K.C., Kerr E.J.C. (1982): Comparison of Agglutination, Complement Fixation and Immunofluorescence Tests in *Campylobacter jejuni* Infections. J. Hyg., 88: 165-171.

31-Yardımcı H., Diker K.S., Akan M. (1994): Use of ELISA Detection of Campylobacter Antibodies in Sheep. Tr. J. Of Veterinary and Animal Sci., 18:129-133.