

Pengembangan Metode Imunokromatografi untuk Deteksi secara Serologi *Campylobacter jejuni* pada Ayam

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETECTING
Campylobacter jejuni ON CHICKEN SEROLOGICALLY

Anwar Rosyidi¹, Setyawan Budiharta²,
Widya Asmara³, Doddi Yudhabuntara²

¹Bagian Mikrobiologi, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram,
Jl Majapahit 62, Mataram, Nusa Tenggara Barat
Telp. 0370 633603, E-mail : ranwarrosyidi@yahoo.com

²Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, ³Bagian Mikrobiologi,
Fakultas Kedokteran Hewan UGM Jl. Fauna 2 Yogyakarta

ABSTRAK

Campylobacter spp dapat menyebabkan infeksi pada manusia dengan kasus gastroenteritis dan sindrom *Guillain-Barre*. *Campylobacter jejuni* merupakan salah satu spesies dari *Campylobacter spp* yang bertanggung jawab sekitar 90% kasus *Campylobacteriosis* pada manusia dengan gejala gastroenteritis. Pencegahan kejadian *Campylobacteriosis* pada manusia dapat dimulai dari penanganan pada tingkat ternak. Kesulitan dalam mendiagnosis agen ini adalah belum tersedianya suatu pengujian yang cepat dan relatif sah. Penelitian ini bertujuan mengembangkan uji diagnostik *C. jejuni* secara serologi pada ayam kampung dengan metode imunokromatografi. Tahapan kerja yang dilakukan meliputi penyiapan kartu tes, preparasi antigen dan optimasi tes imunokromatografi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kartu tes imunokromatografi yang dikembangkan dapat membedakan kasus positif dan negatif *Campylobacter* dengan menggunakan antigen 1,5 ng/ μ L dan volume serum 10 μ L.

Kata-kata kunci : *Campylobacter jejuni*, imunokromatografi tes, dan ayam kampung

ABSTRACT

Campylobacter spp cause infection in human in the form of gastroenteritis and *Guillain-Barre* syndrome. *Campylobacter jejuni* is one of *Campylobacter spp* responsible for about 90% of cases of *Campylobacteriosis* in human with gastroenteritis. Efforts to prevent the incidence of *Campylobacteriosis* in humans should be started with an assessment on its level of poultry. This study aims to develop a diagnostic test for *C. jejuni* on chicken using immunochromatographic serological method. Stages of the research consist of the preparation of test card, antigen preparation, optimization of the antigen and serum. The results showed that immunochromatographic card can distinguish infected serum from the uninfected. The minimum amount of antigen was found to be 1,5 ng/ μ l. It needs 10 μ l serum to perform the test properly.

Keywords : *Campylobacter jejuni*, immunochromatographic, and village chicken

PENDAHULUAN

Campylobacteriosis merupakan penyakit zoonosis. Di beberapa negara maju, kejadian *Campylobacteriosis* lebih banyak dibandingkan kejadian *Salmonellosis*. *Campylobacter jejuni* merupakan bakteri penyebab kasus diare bakterial di Amerika Serikat. Jumlah kasusnya melebihi kasus *Salmonellosis* yakni sebesar

2.000.000-4.000.000/ tahun. *Campylobacter* dapat menular ke manusia melalui daging (Rivoal *et al.*, 2005). Ayam yang sehat dapat membawa *Campylobacter spp* dalam saluran ususnya. Air yang tidak diklorinasi juga menjadi sumber infeksi. Tinja ayam yang mengandung bakteri tersebut berpotensi mencemari daging, sehingga mengonsumsi daging ayam merupakan salah satu faktor risiko terinfeksi

Campylobacter. Daging mentah dan daging tanpa pemasakan sempurna merupakan sarana pembawa infeksi *Campylobacter* ke manusia (Evans *et al.*, 1998). Bukti-bukti menunjukkan bahwa daging mentah terutama daging ayam merupakan sumber utama infeksi ke manusia meskipun sumber-sumber lainnya seperti susu mentah dan air berperan dalam infeksi (Doyle *et al.*, 1992).

Campylobacter dapat menyebabkan perlukaan pada jaringan usus, baik jejunum, ileum maupun pada kolon. Bakteri tersebut dapat menyebabkan luka jaringan karena menginvasi dan merusak sel epitel. Beberapa strain *C. jejuni* menghasilkan *cholera-like enterotoxin* penyebab diare berair. Bakteri tersebut dapat menyebabkan enteritis berdarah, edematus, dan eksudatif. Beberapa kasus infeksi *Campylobacter* terkait dengan kejadian *hemolytic uremic syndrome* dan *thrombotic thrombocytopenic purpura* (Humphrey *et al.*, 2007). Kebanyakan pasien yang terinfeksi berumur di bawah usia 15 tahun. Anak-anak berumur di bawah tiga tahun merupakan populasi yang paling peka (69% kasus) (Al Mahmeed *et al.*, 2005).

Bakteri *C. jejuni* bersifat mikroaerofilik. Pada ayam, bakteri tersebut bersifat komensal sehingga tidak menimbulkan penyakit atau tanda-tanda klinis penyakit (Newell dan Fearnley, 2003). Bakteri *C. jejuni* umumnya tidak bersifat patogen pada unggas, namun pada ayam baru menetas dan kalkun dapat menyebabkan diare. Tanda-tanda klinis diare teramati 24 jam setelah infeksi terhadap ayam umur satu hari. Infeksi eksperimental pada ayam yang baru menetas menghasilkan gejala diare tetapi infeksi pada ayam umur tiga hari dengan dosis 10^9 organisme tidak terlihat perubahan tanda-tanda klinis (Shane, 1992).

Upaya pencegahan kejadian *Campylobacteriosis* pada manusia dapat dimulai dengan pengungkapan dan penanganan pada tingkat sumber ternak. Pengujian *Campylobacter spp* dengan metode kultur pada medium agar selektif umumnya memerlukan waktu sekitar 48-72 jam (Dediste *et al.*, 2003). Isolasi *C. jejuni* memerlukan waktu sekitar tujuh hari dari *enrichment* sampai tumbuh koloni pada media agar selektif dilanjutkan pemurnian koloni (Workman *et al.*, 2005). Pengujian dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dan uji berbasis hibridisasi DNA mempunyai sensitivitas yang tinggi namun membutuhkan biaya yang lebih mahal (Maher *et al.*, 2003).

Gold immunochromatographic assay (GICA) adalah sebuah teknik imunokromatografi baru dengan menggunakan membran nitroselulose sebagai pembawa dan koloid emas berlabel antigen atau antibodi sebagai *tracer*. Metode ini mempunyai banyak keuntungan dibandingkan dengan metode *immunoassay* yang lainnya, seperti prosedur yang sederhana, operasional yang cepat, hasil cepat, harga murah, tidak membutuhkan teknisi dengan kemampuan khusus atau peralatan mahal, dan dapat digunakan untuk mendeteksi antigen dan antibodi. Metode ini banyak digunakan untuk diagnosis beberapa penyakit di samping dapat mendeteksi molekul bioaktif, hormon, dan haptan (Peng *et al.*, 2007). Kawatsu *et al.*, (2008) telah mengembangkan tes imunokromatografi untuk mendeteksi *C. jejuni* pada feses manusia, sedangkan pengujian imunokromatografi untuk mendeteksi *C. jejuni* pada ternak secara serologi masih belum dikembangkan. Penelitian ini bertujuan mengembangkan teknik diagnostik secara serologi yang cepat dan sederhana dengan metode imunokromatografi.

METODE PENELITIAN

Pembuatan Kartu Tes Imunokromatografi

Bahan-bahan yang digunakan untuk pengembangan tes imunokromatografi antara lain membran nitroselulose. Strip dibuat dengan mempersiapkan membran nitroselulose dengan spesifikasi dan persyaratan berwarna putih bersih tidak ada noda, bersifat hidrofilik, dan ukuran pori 5 μm . Membran nitroselulose ini sebagai tempat immobilisasi antigen sehingga terbentuk garis tes dan garis kontrol.

Pada sisi yang berhadapan dengan strip dibuat *signal reagent pad* yang mengandung *signal reagent* yang merupakan suspensi dari partikel emas berukuran 10-50 nm. *Signal reagent* yang dipergunakan merupakan koloid emas yang dikonjugasikan dengan *anti-chicken immunoglobulin Y* (IgY) dan protein A. Pada sisi kartu ini juga dilekatkan *absorbent paper* yang berfungsi untuk menyerap sisa-sisa sampel dan *buffer*.

Pembuatan tes imunokromatografi dimulai dengan menyiapkan kartu sepanjang 300 mm yang terdiri atas membran nitroselulose. Di bagian tengah, ditempelkan antigen dengan konsentrasi hasil optimasi dengan ketebalan 1 $\mu\text{L}/\text{mm}$ membentuk garis sepanjang 280 mm

yang disebut sebagai garis tes (*test line*). Sejajar dengan garis tes, *goat antimouse IgG* ditempelkan di atas membran nitroselulose sebagai garis kontrol/ standar.

Kartu yang sudah dilekatkan antigen, *goat antimouse IgG*, dan *signal reagent* protein A dan *rabbit antichicken IgY* selanjutnya dikeringkan dengan cara inkubasi pada suhu 37° C selama satu jam. Kartu selanjutnya dipotong-potong selebar 5 mm berbentuk strip dengan *automatic shearer*. Strip ditempelkan pada kartu tes pada bagian sisi yang berhadapan dengan *signal reagent* dan *absorbent pad*.

Preparasi Antigen

Isolat bakteri yang dipergunakan sebagai antigen dalam pengujian imunokromatografi adalah *C.jejuni* ATCC 29428 (Microbiologics). Tiga isolat *C. Jejuni* terpilih, kemudian diinokulasikan 10^2 - 10^4 sel pada 5-10 lempeng untuk *Trypticase soy agar* (Oxoid) yang disuplementasi dengan 5% darah domba. Biakan selanjutnya diinkubasikan pada 40°C selama 3-4 hari pada kondisi mikroaerofilik. Panen sel bakteri dilakukan dengan menggunakan ose plastik dan koloni disuspensikan kedalam *phosphate buffer saline* (PBS) 1-2 mL per lempeng biakan. Suspensi bakteri diputar dengan *vortex* selama 1 menit, kemudian disentrifus 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dikumpulkan, selanjutnya disaring menggunakan filter 0,22 µm, lalu didialisis dalam PBS menggunakan membran dialisis (Lee, 1996). Kadar protein diukur dengan kit *protein assay II* (Biorad), selanjutnya disimpan pada suhu -20°C.

Penentuan Konsentrasi Antigen

Konsentrasi antigen yang optimal untuk uji ditentukan dengan pembuatan berbagai konsentrasi antigen yang direaksikan dengan sampel serum yang berasal dari kasus positif dan negatif *C. jejuni* secara kultur. Serum ayam diuji dengan volume 10 µL, 20 µL, dan 30 µL pada bagian *sample pad* kartu tes, sedangkan konsentrasi protein (antigen) yang dipergunakan sebesar 1 ng/µL; 1,5 ng/µL; 2 ng/µL, 2,5 ng/µL, dan 3 ng/µL yang ditempelkan masing-masing secara *linear* pada membran nitroselulose sebagai garis tes dengan menggunakan alat BioDot BioJet™3000.

Penggunaan Tes Imunokromatografi

Kartu tes terlebih dahulu didiamkan selama ± 20 menit agar mencapai suhu ruangan,

kemudian dikeluarkan dari *sachet* aluminium. Kartu diletakkan dengan posisi terbuka di atas tempat yang datar (Gambar 1). Sebanyak 10 µL sampel serum hasil optimasi diteteskan pada bantalan warna biru (1), kemudian satu tetes larutan *buffer* ditambahkan pada bantalan yang sama (2), dua tetes *buffer* pada bantalan *signal reagent* (3), apabila sampel meresap sampai garis batas maka kartu tes segera ditutup (4) (Gambar 1). Hasil uji dilihat melalui jendela pengamatan setelah 15-20 menit. Hasil dinyatakan positif apabila muncul dua garis berwarna merah dan hasil dinyatakan negatif bila muncul hanya satu garis merah pada posisi kontrol serta *invalid* bila tidak muncul garis sama sekali atau hanya muncul pada garis tes. Alat tes imunokromatografi yang dihasilkan disimpan pada suhu antara 2-8° C dan dijaga agar tidak terpapar suhu yang tinggi.

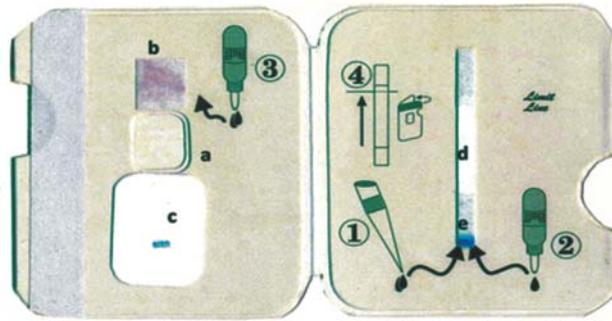
Analisis Data

Data hasil pengembangan kartu tes, optimasi tes imunokromatografi dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

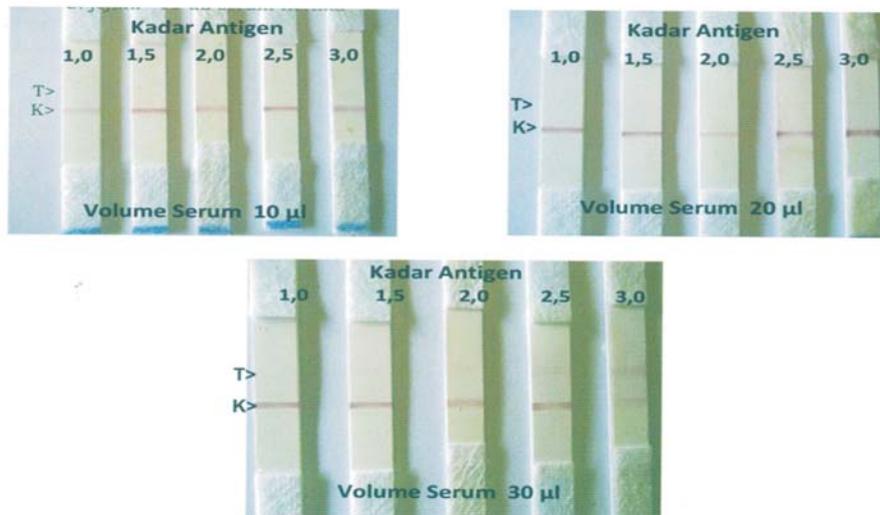
Tampilan bagian dalam kartu tes imunokromatografi untuk pengujian *C.jejuni* secara serologi disajikan pada Gambar 1. Bagian dalam kartu tes terdapat dua sisi yang berhadapan yang harus direkatkan pada saat pengujian. Pada sisi pertama terdapat jendela pengamatan hasil, *signal reagent pad*, dan *absorbent paper*. Pada sisi yang berhadapan terdapat membran nitroselulose dan bantalan sampel. Bagian dalam kartu tes imunokromatografi terdapat membran nitroselulose yang berisi garis kontrol yang ditempelkan antibodi sekunder *goat anti-mouse IgG* dan garis tes yang ditempel antigen *C. jejuni*. Format tes imunokromatografi dengan menggunakan kartu juga dikembangkan oleh Sato *et al.*, (2003) dan Kawatsu *et al.*, (2008).

Antigen *C. jejuni* dengan kadar protein 1 ng/µL; 1,5 ng/µL; 2 ng/µL, 2,5 ng/µL, dan 3 ng/µL yang dioptimasi dengan serum ayam yang negatif kultur dengan volume 10 µL dan 20 µL tidak memperlihatkan warna kemerahan pada garis tes (T) namun hanya muncul warna kemerahan pada garis kontrol (K) atau dinyatakan sebagai hasil negatif (Gambar 2). Serum ayam yang dipergunakan pada volume serum 30 µL dengan antigen kadar protein 1

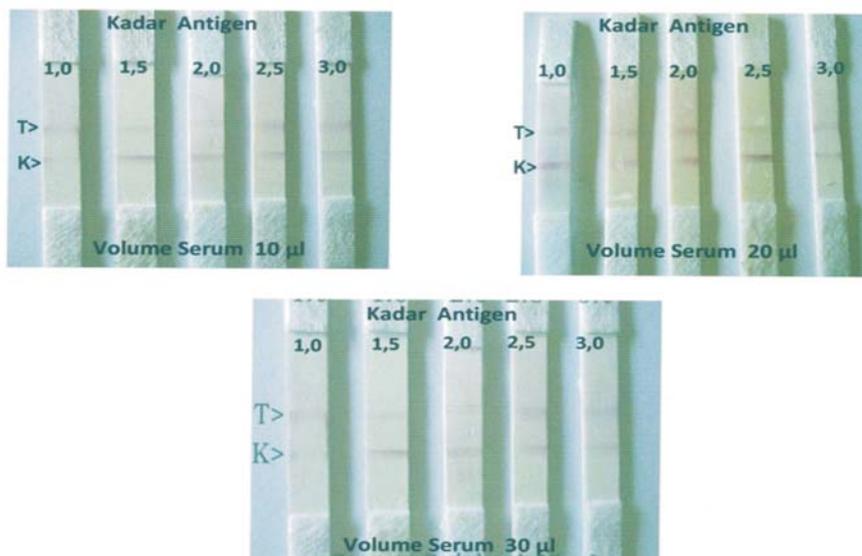


- Keterangan :
- a. Jendela pengamatan
 - b. *Signal reagent pad*
 - c. *Absorbant paper*
 - d. Membran nitroselulose
 - e. Bantalan sampel

Gambar 1. Tampilan bagian dalam kartu tes imunokromatografi untuk uji serologi *Campylobacter jejuni* pada ayam kampung (angka 1,2,3 dan 4 menunjukkan urutan pengujian seperti dijelaskan dalam metode penelitian dalam penggunaan tes imunokromatografi)



Gambar 2. Optimasi kadar antigen (ng/μl) dan volume serum ayam kampung negatif dalam metode imunokromatografi untuk mendeteksi *Campylobacter jejuni* (T = garis tes; K= garis kontrol))



Gambar 3. Optimasi kadar antigen (ng/μl) dan volume serum ayam kampung positif dalam metode imunokromatografi untuk mendeteksi *Campylobacter jejuni* (T = garis tes; K= garis kontrol))

ng/ μ L; 1,5 ng/ μ L; 2 ng/ μ L juga menunjukkan hasil negatif, namun pada antigen dengan kadar 2,5 ng/ μ L dan 3 ng/ μ L dengan volume serum 30 μ l mulai menunjukkan warna merah.

Tes imunokromatografi dengan kadar antigen dan volume serum tersebut berfungsi dengan baik karena pada penggunaan sampel negatif memang seharusnya tidak terbentuk garis merah pada garis tes membran nitroselulose karena pada sampel negatif tidak terdapat antibodi terhadap antigen *C. jejuni*. Tidak timbulnya warna merah pada garis tes dari membran nitroselulose maka uji dinyatakan negatif atau tidak terdeteksi keberadaan *C. jejuni* secara serologi pada ayam kampung. Garis warna merah yang terbentuk pada kontrol disebabkan adanya ikatan antara protein A yang dilabel dengan koloid emas berikatan dengan *goat anti-mouse* IgG yang ditempelkan pada membran nitroselulose pada kartu tes. Garis *linear* berwarna merah muda di bawah atau di atas garis tes merupakan area kontrol sebagai indikasi bahwa uji telah dilakukan dengan baik (Zakoskina *et al.*, 1999).

Protein A dan G dapat meyerupai antibodi sekunder dengan mengikat bagian Fc antibodi primer. Protein ini akan berikatan dengan IgG dengan orientasi yang berbeda dengan fungsi normal antibodi yang berperan dalam proses opsonisasi dan fagositosis. Protein tersebut tidak mempunyai afinitas yang baik terhadap molekul immunoglobulin M (IgM) dan immunoglobulin D (IgD). Protein tersebut banyak digunakan karena bersifat universal terkait dengan kemampuannya mengikat antibodi primer pada beberapa spesies. Protein A dan G tidak mempunyai afinitas yang baik terhadap antibodi primer IgY pada unggas. Protein ini tidak mengikat IgY pada serum ayam yang dideteksi, sehingga tidak menimbulkan garis liner merah pada kartu tes (Graille *et al.*, 2000)

Optimasi antigen *C. jejuni* dengan serum ayam positif, menunjukkan antigen dengan kadar protein 1,0 ng/ μ L dan volume serum 10 μ L menunjukkan hasil dengan garis tes (T) positif, namun belum terlihat jelas. Penggunaan antigen dengan kadar 1,5 ng/ μ L; 2 ng/ μ L, 2,5 ng/ μ L, dan 3 ng/ μ L dengan volume serum 10 μ L, 20 μ L, dan 30 μ L memperlihatkan warna merah pada garis tes (T) yang lebih jelas. Penggunaan antigen dengan kadar protein 1,0 ng/ μ L dengan volume serum 20 μ L dan 30 μ L sudah terlihat garis merah pada garis tes (T) dan garis kontrol (K) (Gambar 3). Garis merah pada kartu tes imunokromatografi berarti

terdapat antibodi terhadap *C. jejuni* pada serumnya. Garis merah yang terbentuk ini menunjukkan bahwa terdapat ikatan antara antigen yang ditempelkan pada membran nitroselulose dengan antibodi pada serum ayam. Garis merah yang muncul menunjukkan bahwa ayam kampung tersebut terinfeksi *C. jejuni*. Ikatan terjadi antara antigen *C. jejuni* dengan IgY pada serum ayam. Sebelum berikatan dengan antigen, IgY ayam terlebih dahulu berikatan dengan antibodi sekunder yaitu *rabbit polyclonal secondary antibody to chicken* IgY yang dikonjugasi dengan 15 nm emas dan membentuk kompleks antigen, antibodi, dan antibodi sekunder yang berlabel.

Dalam Penelitian ini sebagai *signal reagent* tidak menggunakan antibodi sekunder berupa IgG namun menggunakan antibodi sekunder IgY. *Signal reagent* adalah penanda yang memperlihatkan warna merah pada garis tes, yang berarti terdapat ikatan antigen, antibodi primer, dan antibodi sekunder. Antibodi sekunder tersebut dihasilkan pada kelinci dengan immunogen IgY *whole* ayam dan akan bereaksi dengan IgY unggas. Apabila menggunakan anti-IgG maka tidak akan terjadi ikatan antara antibodi sekunder tersebut dengan IgY ayam. Antibodi ayam berbeda dengan immunoglobulin pada mamalia. Immunoglobulin Y merupakan tipe antibodi utama pada ayam, burung, reptil dan lungfish. Immunoglobulin Y juga ditemukan dengan konsentrasi tinggi pada kuning telur ayam. Immunoglobulin Y masih sering disalah-artikan sebagai IgG. Immunoglobulin Y berbeda baik secara struktural maupun fungsional dengan IgG mamalia. Immunoglobulin Y tidak bereaksi silang dengan antibodi yang muncul terhadap IgG mamalia (Rudiger *et al.*, 2001). Seperti halnya IgG, IgY tersusun dari dua rantai ringan dan dua rantai berat. Immunoglobulin Y mempunyai massa molekul 65,100 amu (*atomic mass units*) yang lebih besar daripada IgG. Rantai ringan IgY dengan massa molar sekitar 18,700 amu yang lebih ringan dari pada rantai ringan IgG. Tidak seperti IgG, IgY tidak dapat mengikat protein A, protein G, dan tidak mengaktifkan sistem komplemen. Immunoglobulin Y pada ayam tidak dapat diikat atau dideteksi dengan anti IgG dari spesies mamalia atau rodensia. IgG pada manusia, tikus, kelinci dapat diikat dengan anti-IgG dari beberapa spesies hewan (Davison *et al.*, 2008).

Format tes diagnostik imunokromatografi yang dikembangkan adalah untuk mendeteksi

IgY pada serum ayam terhadap *C. jejuni*. Metode imunokromatografi yang dikembangkan menggunakan prinsip *reverse flow immunochromatographic test*. Format metode imunokromatografi dengan prinsip *reverse flow immunochromatographic test* juga dilakukan oleh Sato *et al.*, (2003) dan Kawatsu *et al.*, (2008). Format tes imunokromatografi pada tes kehamilan umumnya menggunakan prinsip *lateral flow test (one way test)*. Pada *lateral flow test* prinsipnya ketika sampel diuji pada tempat sampel maka akan langsung mengalir melalui tes strip membran nitroselulose dan ketika melewati garis kontrol akan terbentuk garis merah dan selanjutnya apabila sampel positif akan terbentuk garis merah pada garis tes. Metode *reverse flow test* pada imunokromatografi yang dikembangkan, prinsipnya adalah ketika sampel serum yang diuji pada tempat sampel dibiarkan mengalir pada membran nitroselulose melewati garis kontrol dan garis tes atau garis antigen. Pada posisi tertentu aliran pereaksi dibalik sehingga *signal reagent* (dalam hal ini protein A yang dikonjugasi dengan koloid emas dan antibodi sekunder dalam hal ini *rabbit polyclonal secondary antibody to chicken IgY* yang dikonjugasi dengan 15 nm *gold*) akan melewati garis tes (antigen *C.jejuni*) dan garis kontrol (*goat anti-mouse IgG*). Apabila serum ayam positif mengandung IgY terhadap *C. jejuni* akan terjadi kompleks ikatan antara *rabbit polyclonal secondary antibody to chicken IgY-15 nm gold*, antibodi dan antigen yang ditandai dengan munculnya warna merah pada garis tes. Selanjutnya ketika melewati garis kontrol akan terjadi ikatan antara protein A-*gold* dengan *goat anti-mouse IgG* yang membentuk garis kontrol yang berwarna merah. Pada serum yang negatif karena tidak adanya antibodi yang mengikat antigen maka tidak terbentuk kompleks antigen, antibodi primer dan antibodi sekunder sehingga tidak akan terbentuk warna merah pada garis tes, namun hanya akan terbentuk warna merah pada garis kontrol. Menurut Zakoskina *et al.*, (1999) yang melakukan studi pada kasus *Brucellosis* memperlihatkan bahwa partikel yang berlabel koloid emas akan membentuk kompleks emas dan antibodi. Kompleks tersebut bergerak pada membran nitroselulose kemudian membentuk garis tes yang dilekatkan antigen yang diimobilisasi. Garis kedua yang merupakan garis kontrol akan terlihat pada jendela pengamatan. Hal tersebut menunjukkan bahwa fungsi alat tes berjalan benar.

Uji imunokromatografi yang dikembangkan untuk mendeteksi keberadaan antibodi terhadap *C. jejuni* pada ayam kampung menunjukkan hasil positif yang berarti bahwa uji ini dapat mendeteksi kejadian *C. jejuni*.

SIMPULAN

Kartu tes imunokromatografi yang dikembangkan dapat berfungsi dengan baik dan dapat membedakan antara kasus *Campylobacter* negatif dengan teramatinya satu garis *linear* merah pada bagian kontrol dengan *Campylobacter* positif dengan teramatinya dua garis *linear* merah pada bagian tes dan kontrol, dengan menggunakan antigen 1,5 ng/ μ L dan volume serum 10 μ L.

SARAN

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan untuk mengembangkan metode imunokromatografi untuk mendeteksi *C. jejuni* pada beberapa hewan dan manusia secara serologi agar dapat mendeteksi keberadaan IgM terhadap *C. jejuni*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional yang telah memberikan dana penelitian Hibah Doktor Tahun 2009 dan Kepala PT. Bioramp Diagnostika Mataram yang telah membantu dalam teknis pengembangan tes imunokromatografi.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mahmeed A, Senok AC, Ismaeel AY, Bindaayna KM, Tabbara KS and Botta GA. 2006. Clinical relevance of virulence genes in *Campylobacter jejuni* isolates in Bahrain. *Med Microbiol* 55 : 839-843
- Davison TF, Kaspers B, Schat KA. 2008. *Avian Immunology*. London UK. Academic Press. ISBN 97801237. P 418

- Dediste A, Vandenberg O, Vlaes L, Ebraert A, Douat N., Bahwere P, Butzler JP. 2003. Evaluation of the Prospect microplate assay for detection of *Campylobacter jejuni*, a routine laboratory perspective. *Clin Microbiol. Infect* 9 : 1085-1090
- Doyle MP, Jones DM, Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, 1992. *Campylobacter jejuni* - current status and future trends. Washington DC: American Society for Microbiology. Pp. 45-48
- Evans MR, Lane W, Frost JA, Nylen G. 1998. A *campylobacter* outbreak associated with stir-fried food. *Epidemiol Infect* 12 : 275-279
- Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, Silverman GJ. 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci* (10): 5399-404
- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology* 117 (3) : 237
- Kawatsu K, Kumeda Y, Taguchi M, Yamazaki-Matsune W, Kanki M, Inoue K. 2008. Development and evaluation of Immunochromatographic assay for simple and rapid detection of *C. jejuni* and *C. coli* in human stools specimens. *J Clin Microbiol* 46 (4): 1226-1231
- Lee A. 1996. *Helicobacter pylori Techniques for Clinical Diagnosis and Basic Research*. Kensington Australia. WB Saunders.
- Maher MC, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carroll C, Cormican, M. 2003. Evaluation of culture methods and DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *J Clin Microbiol* 41 : 2980-2986
- Newell DG, Fearnley C. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 69(8) : 4343-4351
- Peng DP, Hu SS, Hua Y, Xiao YC, Li ZL, Wang XL, Bi DR. 2007. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for detection of antibodies against avian influenza with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. *Vet Immunol Immunopathol* 117: 17-25
- Rivoal K, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ernel G. 2005. Genomic Diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* Isolates Recovered from Free-Range Broiler Farms and Comparison with Isolates of Various Origins. *Appl Environ Microbiol*. 71(10) : 6216-6227
- Rudiger S, Irine B, Erhard M, Hilnok A, Staak C. 2001. *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application*. Berlin. Springer-Verlay.
- Sato NS, Melo CSD, Zerbini LCMS, Silveira EPR, Fagundes LJ, Ueda M. 2003. Assesment of the rapid test based on an immunochromatography technique for detecting anti-*Treponema pallidum* Antibodies. *Rev Inst Med Trop* 45(6) : 319-322
- Shane SM. 1992. The significance of *Campylobacter jejuni* infection in poultry: a review. *Avian Pathology* 21: 189-213
- Workman SN, Mathison GE, Lavoie MC, 2005. Pet dog and chicken meat as reservoir of *Campylobacter spp* in Barbados. *J Clin Microbiol* 43(6) : 2642-2650
- Zakoskina T, Kalinovskii I, Markov E, Esina NL, Golubinskii EP. 1999. Use of protein – polysaccharide *Brucella* antigen labeled with colloidal gold for detection of specific antibodies by the dot-immunoassay method. *Clin Lab Diag* 3 : 39-41.