Gülnur SAĞLAM MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS ŞANLIURFA-2021

**T.C.**
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
**VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

# KOYUNLARDA CHLAMYDİA ABORTUS'A KARŞI GELİŞEN SEROLOJİK YANITIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE BİR ELİSA PROTİPİNİN GELİŞTİRİLMESİ

**Gülnur SAĞLAM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK**

**ŞANLIURFA-2021**

# KOYUNLARDA CHLAMYDİA ABORTUS'A KARŞI GELİŞEN SEROLOJİK YANITIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE BİR ELİSA PROTİPİNİN GELİŞTİRİLMESİ

**Gülnur SAĞLAM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**
**Prof.Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK**

**Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20026 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ŞANLIURFA-2021**

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen, başta tez danışmanım sayın Prof.Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK'e, Anabilim Dalı Başkanım sayın Prof.Dr. Oktay KESKİN, bölüm hocam Prof. Dr. Osman Yaşar TEL ve meslektaşım Doç. Dr. Sencer KARAGÜL olmak üzere, bu süreçte bana en büyük desteği veren değerli eşim Dr. Kamil SAĞLAM'a teşekkür ederim.

**Gülnur SAĞLAM**

**İÇİNDEKİLER**


| | | |
|---|---|---|
| | TEŞEKKÜR | IV |
| | İÇİNDEKİLER | V |
| | ŞEKİLLER DİZİNİ | VI |
| | TABLOLAR DİZİNİ | VIII |
| | KISALTMALAR VE SİMGELER | IX |
| | ÖZET | XI |
| | ABSTRACT | Xİİİ |
| 1. | GİRİŞ | 1 |
| 2. | GENEL BİLGİLER | 2 |
| | 2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma | 2 |
| | 2.2.1. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü | 4 |
| | 2.3. Antijenik Yapısı | 6 |
| | 2.3.1. Lipopolisakkarit (LPS) | 6 |
| | 2.3.2. Major Dış Membran Proteini (MOMP) | 6 |
| | 2.3.3. Polimorfik Dış Membran Proteinleri (POMP) | 6 |
| | 2.3.4. Kazeince Zengin Dış membran Proteinleri | 7 |
| | 2.3.5. Isı Şok Proteinleri | 7 |
| | 2.3.6. Glikolipid Antijenleri | 7 |
| | 2.4. Epidemiyolojisi | 7 |
| | 2.4.1. Konakçı Dağılımı | 7 |
| | 2.4.2. Enzootik Abortus'un Dünyadaki ve Türkiyedeki Durumu | 8 |
| | 2.4.3. Etkenin Dayanıklığı | 9 |
| | 2.4.5. Enfeksyion ve Bulaşma | 9 |
| | 2.5. Patogenez | 11 |
| | 2.6. Klinik Bulgular | 12 |
| | 2.7. Bağışıklık | 13 |

2.8. Zoonotik Önemi 13
2.9 Teşhisi 14
2.9.1 Bakteriyel teşhis 14
2.9.2. Moleküler Yöntemler 16
2.9.3. Serolojik Testler 17
2.10. Tedavi ve Kontrol 18
3.GEREÇ ve YÖNTEM 19
3.1.Gereç 19
Referens Bakteriyel Suş 19
Referens Pozitif ve Negatif Serum Örnekleri 19
ELISA İçin Kullanılan Solüsyonlar 20
3.2.Yöntem 21
Embriyolu tavuk yumurtasına ekim 21
PZR 21
ELISA antijeninin hazırlanması 22
İndirekt serum ELISA prototipinin geliştirilmesi 22
İstatiksel Analiz 23
4.BULGULAR 24
5.TARTIŞMA ve SONUÇ 28
6.KAYNAKLAR 31
7.EKLER 39
Etik Kurul 39
Orjinallik Beyanı 41
Turnitin 42
Tez Veri Giriş Formu 44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1**. *Chlamydia abortus*'un yaşam döngüsü

**Şekil 2**. *Chlamydia abortus*'un yaşam döngüsü

**Şekil 3.** Yeni geliştirilen ELISA prototipi ile alınan sonuçlar

**Şekil.4** PCR sonuçları. M**.** Marker 1. Pozitif kontrol 2-6. ve 8. pozitif kontrol serumlarının elde edildiği abort yapmış koyunların C.abortus PZR sonuçları 7. Kuyucuk negatif kontrol

## TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo 1:** Home made ELISA ve ticari ELISA arasındaki uyum, özgüllük, duyarlılık ve doğruluk sonuçları

## KISALTMALAR VE SİMGELER

| | |
|---|---|
| **ADP** | Adenozin Difosfat |
| **ATP** | Adenozin Trifosfat |
| **CFT** | Komplement Fiksasyon Testi |
| **CPAF** | Proteaz / Proteozom Benzeri Aktivite Faktörü |
| **DNA** | Deoksiribonükleik Asit |
| **EB** | Elementer bodies (cisimcikler) |
| **ELISA** | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| **HI** | Hemaglütinasyon İnhibisyon |
| **HRPO** | Horse Radish Peroxidase |
| **IFAT** | İndirekt Fluoresan Antikor Testi |
| **IgG** | Immunglobulin G |
| **IgM** | Immunglobulin M |
| **KEA** | Koyunların Enzootik Abortusu |
| **KFT** | Komplement Fiksasyon Testi |
| **LGV** | Lenfogranüloma Venereum |
| **LPS** | Lipopolisakkarit |
| **MHC** | Major Histokompatabilite Kompleks |
| **MOMP** | Major Dış Membran Proteini |
| **OIE** | Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü |
| **Omp2** | Dış Membran B Proteini |
| **Omp3** | Dış Membran A Proteini |
| **PBS** | Fosfat Tampon Çözeltisi |
| **PCR** | Polymerase Chain Reaction |
| **POMP** | Polimorfik Dış Membran Proteinleri |
| **PZR** | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| **RB** | Retiküler bodies (Cisimcik) |
| **RNA** | Ribonükleik asid |
| **SVKE** | Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü |
| **WHO** | World Health Organisation |

# ÖZET

## KOYUNLARDA CHLAMYDİA ABORTUS'A KARŞI GELİŞEN SEROLOJİK YANITIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE BİR ELİZA PROTİPİNİN GELİŞTİRİLMESİ

**Gülnur SAĞLAM**

**Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi**

Koyunların Enzootik abortusu (KEA), dünyanın birçok yerinde yaygın olarak görülen ciddi enfeksiyonlarla karakterize önemli bir zoonozdur. Hastalık hayvancılık sektöründe büyük ekonomik kayıplar oluşturmaktadır.

*Chlamydia abortus* izolasyonun zor ve zaman alıcı olması nedeniyle infeksiyonun tanısında serolojik testlerden büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testinin sensivitesi ve spesivitesinin diğer serolojik testlerden yüksek olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada serumda anti *C. abortus* antikorlarını saptamak için bir ELİZA prototipi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü (SVKE) Seroloji labaratuvarına, Samsun ili ve çevre illerden atık etkenlerinin tanısı amacıyla gönderilen ve ticari (C.abortus Antibody kit, IDEXX) bir kit ile test edilen serumlar iki ELIZA sonuçlarını karşılaştırmak amacı ile kullanıldı ve iki test arasındaki kappa değeri 0,95 olarak bulunarak iki test arasında yüksek bir uyum saptandı. Çalışmada ayrıca, atık yapan hayvanın fötal dokularından (karaciğer, dalak, mide içeriği) yapılan PCR ile KEA yönünden pozitif bulunan koyunlara ait serumlar gerçek pozitif serum olarak kullanıldı. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre, duyarlılık % 90[%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%80.36-99.9)] ve özgüllük (spesifisite) %96,6[%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%85.16-99.47)] olarak saptandı.

Çalışmanın sonunda elde ettiğimiz bulgular, indirekt antikor ELİZA protipinin oldukça duyarlı ve özgül olduğunu ortaya koymuş ve bu testin hastalığın serolojik olarak

yaygınlığının belirlenmesinde ucuz ve pratik bir alternatif olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelime:** *Chamydia abortus*, İndirekt ELISA, Koyun

## ABSTRACT

### TO DEVELOP AN ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA) PROTOTYPE IN EVALUATİNG SEROLOGİCAL RESPONSE AGAİNST CHLAMYDIA ABORTUS İN SHEEP

**Gülnur SAĞLAM**

**Veterinary Department of Microbiology, Master Thesis**

**Keywords:** *Chamydia abortus*, Indirect ELISA, Sheep

Enzootic abortion of ewes (EAE) is an important zoonosis which is commonly seen in many parts of the world. It causes important economical losses in livestock industry.

Isolation of *Chlamydia abortus* is highly difficult and time consuming. Therefore, serological tests are widely used in diagnosis of the disease. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) has higher sensitivity and specificity than other tests used in the serological diagnosis of EAE and thus, it is considered one of the best choices in this purpose.

In this study, we plan to develop an in house ELISA to detect antibodies against C.abortus. Sera sent to the Serology Laboratory of Samsun Veterinary Control Institute (SVKE) from Samsun and surrounding provinces were tested both ELISA, which are a commercial kit (C.abortus Antibody kit, IDEXX) and our in house ELISA prototype for to compare the results of both ELISAs. The kappa value was detected as 0, 95 showing good compatibility between two tests. In order to determine specificity and sensitivity of the in house ELISA, real positive sera were obtained from the sheep aborted because of C.abortus. This condition was confirmed by PZR made from DNA extracted from aborted foetal material of these aborted ewes. According to the results, specificity and sensitivity of our in house ELISA were detected 96,6 %[95% (confidence intervals(%85.16-99.47)] and 90 %[95% (confidence intervals(%80.36-99.9)], respectively.

As conclusion, our in house indirect ELISA revealed good sensitivity and specificity values. We thought that it can be used to determine serological positivity rates of the disease as much cheaper and paractical alternative to its commercial counterparts.

**Keywords:** *Chamydia abortus*, Indirect ELISA, Sheep

# 1.GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliği, ülkemiz hayvancılığında önemli bir yer tutmaktadır. Koyun yetiştiriciliğinde, infertilitiye ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan en önemli problem abortlardır. *Chlamydia abortus (Chlamydia psittaci Serotip-1)* kaynaklı enfeksiyonlar Koyunların Enzootik Abortusu (KEA) olarak adlandırılmaktadır**.**

*C. abortus* enfeksiyonunun teşhisi, direkt ve indirekt yöntemlerle yapılmaktadır. Etkenin izolasyonu, deneyimli personel gerektirmesi, zoonotik risk oluşturması ve zaman alıcı olması nedeniyle güçtür. Bu nedenle Klamidyoz'un indirekt teşhisinde serolojik testler çok yaygın olarak kullanılır. Bunlar, lam aglütinasyon testi, komplement fiksasyon testi (KFT), indirekt fluoresan antikor testi (IFAT), hemaglütinasyon inhibisyon (Hİ) testi ve ELISA'dır. Çok sayıda serum örneğinin incelenmesinin zorunlu olduğu durumlarda, pratik, kısa sürede çok sayıda örneğin işlenmesine olanak sağlayan indirekt ELISA, en fazla tercih edilen ve OIE tarfından da önerilen bir serolojik testtir.

Bu çalışmada KEA'nun teşhisinde tercih edilen bir yöntem olan indirekt ELISA in house olarak geliştirilmesi hedeflendi. Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü (SVKE) Seroloji labaratuvarına, Samsun ili ve çevre illerden atık etkenlerinin tanısı amacıyla gönderilen ve ticari (IDEXX Chlamydophila abortus Antibody Test Kit) ile test edilip serum bankasında bulunan serumlar yeni geliştirilen ELISA ile test edilip her iki test karşılaştırıldı. Ayrıca gerçek pozitif ve negatif serumlar kullanılarak geliştirilen prototipin tanısal duyarlılık ve tanısal özgünlüğü saptandı. Sonuçta yeni geliştirilen ELISA prototipi gerek ticari kitle büyük bir uyum göstererek ve gerekse gerçek pozitif ve negatif seumlar ile denenerek verdiği uygun tanısal özgüllük ve duyarlılık nedeni ile hastalığın serolojik teşhisinde yaygın olarak kullanılabilecek ve büyük bir biyogüvenlik avantajı sağlamış bir kit olarak değerlendirildi.

# 2.GENEL BİLGİLER

## 2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Chlamydioz, Trahom adıyla M.Ö 27. yüzyılda Çin'de, 19. yüzyılda Mısır'da tanımlanmıştır. Ritter, İsviçre'de 1879 yılında ortaya çıkan salgın üzerinde çalışmalar yapmış, hastalığı pnömotifüs olarak adlandırmıştır. 1894 yılında Morange insanlarda görülen hastalığın, papağandan geçtiğini tesbit etmiş ve hastalığa "Pisttakozis" adını vermiştir. Klamidya"nın tanımı 1907 yılına dayanmaktadır. Halberstaedter ve Von Prowazek (1907) bir trahoma vakasına ait konjuktival kazıntıda Giemsa boyamada intrastoplazmik vakuoller içerisinde etkeni görmüşler ve protozoon olduğunu düşünerek etkene *Chlamydiazoon psittaki* adını vermişlerdir (1). Hastalık ilk kez Durand, Nicolas ve Favre (1913) tarafından Lenfogranüloma venereum (LGV) olarak adlandırılmıştır.1965 li yıllarda hastalık TWAR olarak tanınlanmıştır (2-4). 1929-1930 yıllarında, kuşlarla temas halindeki insanlarda görülen akut ve atipik pnömoni vakalarında hem kuşlarda, hem insanlarda bulunan etkenin psitakoz etkeni olduğu ortaya çıkmıştır (1). Greig (1936) gebe koyunlarda atıklara neden olan bir hastalıktan bahsetmiş ancak hiçbir bakteriyi izole edemediğini bildirmiştir. Stamp ve ark (1950) hastalığı koyunların enzootik abortusu olarak adlandırmışlar, hastalığın teşhisinde gördükleri elementer cisimciklerin, rickettsia veya psittacosis-lymphogranuloma grubuna benzetmişlerdir. Elementer cisimciklerin de fötal membranlarda çoğalması ile karakterize olduğunu ifade etmişlerdir (2). 1966'da elektron mikroskopla yapılan incemelerde; Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısının olduğu, DNA, RNA ve ribozom içerdiği görülmüş ve bakteri olarak sınıflandırılmıştır (3). "Tang ve ark" (1957) trahoma suşunu embriyolu tavuk yumurtasının sarı kesesinde kültüre etmişlerdir. Bu dönemde *Chlamydiaceae* bir çok monolayer hücrede üretilebilmektedir (4).

Klamidia'lar bir dönem bakterilerle viruslar arasında geçiş mikroorganizmaları olarak görülmüş; *Rikettsia psittaci, Ehrlichia psittaci, Rickettsia formis, Bednosia* ve *Miyagavenella* adlarıylada tanımlanmışlardır (5). Yirminci yüzyılın başlarında bakteriyel filtrelerden geçebilecek kadar küçük olmaları, besiyerinde üreyememeleri sebebiyle virüs oldukları düşünülmüştür (6). Fakat antibiyotiklere olan duyarlılıkları hem DNA ve hem de RNA içermeleri, Gram negatif bakterilere benzer sert bir hücre duvarına sahip

olmaları, bölünerek çoğalmaları ve kompleks bir enzim aktivitesine sahip olmaları nedeniyle bakteri grubu olduğu anlaşılmıştır. Günümüzde özel bir bakteri tipi olarak kabul edilmektedir (7).

Bir dönem klamidyal serotiplerin konakçı ve hastalığa özgü olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle klamidyalar; insanlarda, Chlamydia *trachomatis ve Chlamydia pneumoniae*, ruminantlarda *Chlamydia pecorum*, kanatlılarda *Chlamydia psittaci* olmak üzere dört türde sınıflandırılmışlardır (8). Everet ve Andersen (1999) klamidya cinsi yeniden düzenlenmiş, 16S ve 23S rRNA genlerinin sekans analizi esas alınarak; *Chlamydiaceae* ailesi, Chlamydia ve Chlamydophila olarak iki cins ve dokuz tür olarak sınıflandırılmıştır (9).

Mikrobiyologlar tarafından söz konusu klasifikasyon; *Chlamydiaceae* genomunun karşılaştırmalı genom analizi esas alınarak tek cins olması gerektiği belirtilmiştir (10). *Chlamydia* türleri *Eubakteria* aleminde, *Chlamydiae* sınıfında, *Chlamydiales* takımında ve *Chlamydiaceae* ailesinde tek bir cis ve dokuz tür olarak sınıflandırılmışlardır. Bu cinsin içinde *Chlamydia muridarum, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia pecorum, Chlamydia suis, Chlamydia abortus, Chlamydia felis, Chlamydia caviae, Chlamydia psittaci* ve *Chlamydia trachomatis* olmak üzere 9 tür bulunmaktadır (11). *C. muridarum*; fare, gine domuzu ve hamsterlarda solunum sistemi enfeksiyonuna yol açar. Bir dönem yalnızca insan patojeni olduğu düşünülen *C. pneumonia*; insanlarda, atlarda sürüngenlerde, amfibilerde ve koalalarda solunum sistemi enfeksiyonuna yol açar. İnsanlarda hastalık etkeni olan *C. trachomatis*; nadiren koalalarda da hastalık yapar. Çok sayıda serovarı bulunmaktadır. Neden olduğu hastalıklar; trahoma, lenfogranuloma venereum, pnömoni, yeni doğanlarda konjuktivit, artrit ve ürogenital yol enfeksiyonlarıdır. *C. felis*; Kedileri infekte ederek konjuktivite ve pnömoniye sebep olur. *C. suis*; Domuzlarda enterit, konjuktivit ve pnömoniye sebep olur. *C. cavia;* kobaylarda, keratokonjunktivite sebep olur. Atların konjunktival ve nazal sürüntülerinde de rastlanmıştır. *C. pecorum*: Koyun, keçi, sığır ve domuzlarda pnömoni, abort, enterit, artrit, poliartrit, konjuktivit ve sporadik bovine ensefalitise sebep olur (12). Daha önce yapılan çalışmalarda *C. psittaci* serotip I olarak adlandırılırılan *C. abortus*; koyun ve keçilerde koyunların enzootik abortusuna, sığır, domuz ve insanda klamidyal aborta sebep olur (13). *C. psittaci* birçok evcil kuş türü ve kümes hayvanlarını infekte etmekle beraber, zoonoz olduğundan halk sağlığını tehdit etmektedir (14).

2014 yılında bu sınıfa 2 tür daha eklenmiş ve sayı 11'e çıkmıştır. *Chlamydia gallinacea* tavuk, hindi ve beç tavuklarında, *Chlamydia avium* ise güvercinlerde enfeksiyona yol açtığı tespit edilmiştir (15). Bunun yanı sıra mısır turnasından, *Chlamydia ibidis* (16), Şahinlerden, *Chlamydia buteonis* (17) ve yılanlardan izole edildiği bildirilen edilen *Chlamydia sanzinia, Chlamydia serpentis* ve *Chlamydia poikilothermis* yeni aday türlerdir (18).

Türkiye'de Eskişehir'in Beylikahır ilçesi ve köylerinde Atamanve Hakioğlu (1955), ilk olarak koyunlarda hastalığı teşhis etmiştir (19). Bandırma Merinos Çiftliği ile Tahirova Türk-Alman Çiftliğindeki yavru atan koyunlarda, Yılmaz (1962) koyunların enzootik abortusunu serolojik olarak teşhis etmiştir (20).

### 2.2.1. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

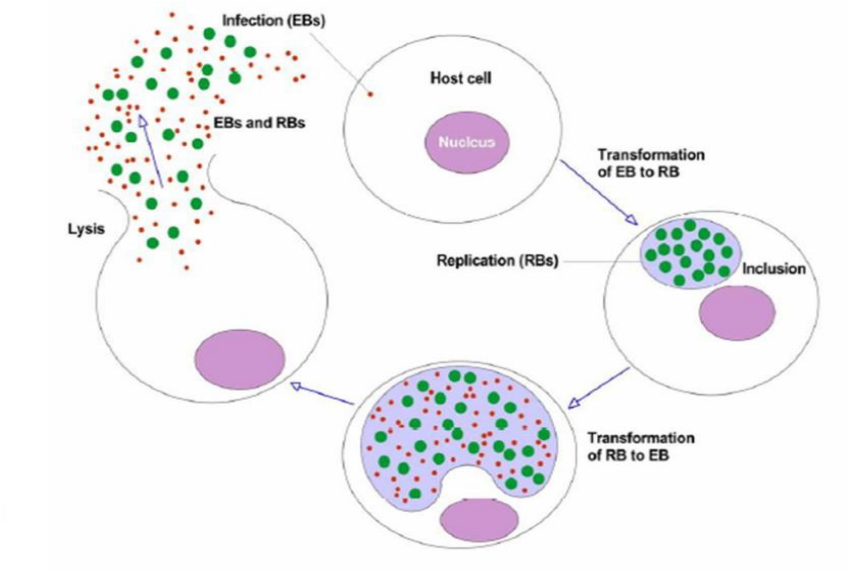
*Chlamydia abortus;* Gram(-), pleomorfik, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, kokoid bifazik yaşam döngüsüne sahip, obligat intracellüler bir bakteridir (21). Üreyeyebilmeleri için canlı hücreye ihtiyaç duyarlar. Sıvı yeya katı besiyerinde üreyemezler. Bu amaçla dokulardan, hücre kültürlerinden ve yumurta sarısı zarlarından yapılan (Ziehl-Neelsen Giemsa, Macchiaveola, Stamp, Castenada, Gimenez vs.) preparatlarda mikroorganizmalar, hücre içinde ve dışında tek tek veya kümeler halinde, yuvarlak-oval biçimlerde görünürler (22). Giemsa ile koyu mor, Stamp'la pembe, Castenada ile mavi, Macchiavello ve Gimenez ile kontrast renkle boyanmış zeminde kırmızı renkte görünmektedirler. Genelde, Gimenez boyama diğer boyama yöntemlerine tercih edilmektedir (23,24).

*Chlamydia abortus,* kendine özgü bir yaşam döngüsüne sahiptir. Etken konakçı hücre içinde retiküler cisimcik (RB) ve elementer cisimcik (EB) olmak üzere 2 farklı formda bulunur (25). Elementer cisimcikler (EB) metabolik olarak inaktif, çevresel etkenlere karşı dayanıklı ve hücre dışında çoğalmadan canlılıklarını sürdürebilen infeksiyöz formdur. Retiküler cisimcik (RB) ise metabolik olarak aktif, hücre içinde çoğalan ancak infeksiyöz olmayan formdur. Elementer cisimcikler (EB) yaklaşık 0,3-0,5 µm çapında, küçük ve oval bir şekle sahiptir. Bunlar kompakt nükleer materyale ve az oranda ribozomlara sahip olup sert bir hücre duvarı ile çevrilidir. Hücre duvarının yapısındaki major dış membran proteini (MOMP) bakteriyi çevresel şartlara karşı dayanıklı kılar (26). Retiküler cisimcik (RB) yaklaşık 1 µm boyutunda, yoğun bir DNA

içerir ve RNA açısından daha zengindir. Hücre duvarı, lipopolisakkarit (LPS)'ten zengindir. Bakterinin yapısal özellikleri, hücre içi çoğalma, besin maddelerinin alınması ve atıkların uzaklaştırması gibi metabolik aktiviteleri yapmasına imkan sağlar(24). Metabolik olarak çok aktif olmalarına karşın metabolizma ve çoğalmaları için gerekli olan ATP sentezini yapamazlar. Bu nedenle infekte ettikleri konak hücrenin ATP/ADP transport sistemi ile konak hücreden enerji gereksinimini karşılarlar. Konak hücreden nükleik asit prekürsörlerini sağlayıp kendi enzimlerini kullanarak DNA ve RNA moleküllerini sentezleyebilirler (27,28).

*C.abortus*'u da içeren tüm üyeler zorunlu hücre içi aşamaları içeren iki fazlı gelişim döngüsünü izler(29). İnfekte ettikleri hücre sitoplazmalarında inklüzyon oluşturara çoğalan C. abortus'un yaşam döngüsü elementer cisimciklerin (EB) konak hücreye adezyonu ile başlar. Elementer cisimcikler (EB) konakçının solunum, gastroenterik, genital kanalındaki fagositik hücrelere veya mukoza epiteline lokalize olur. Daha sonra bakteri, konakçı hücresindeki gelişimini tamamlar (30).

Elementer cisimcik (EB); konakçı hücrelerin trofoblast hücrelerince, fagosite edilmeden önce konakçı hücreye bağlanır. Bu fazda metabolik aktivite oldukça düşüktür. Hücre tarafından fogosite edilen elementer cisimcikler inklizyon adı verilen endozomal vakuolleri oluşturur. Metabolik aktivite 12-24 saat içinde başlar. Metebolik aktivitenin başlamasından 24-48 saat sonra elementer cisimciğin nükleusu parçalanır. Bunun akabinde retiküler cisimcik oluşur. Daha sonra inkluzyon cisimcikleri içerisinde, retiküler cisimcikler ikiye bölünerek çoğalmaya başlar. Çoğalma tamamlandıktan sonra retiküler cisimcikler protein ve karbonhidrat sentezininde başlamasıyla 20-30 saat sonra tekrar elementer cisimciklere dönüşür (26,30). Hücrenin lize olmasıyla beraber sayısı milyonları bulan elementer cisimcikler, uterus akıntıları, süt, idrar, dışkı yoluyla etrafa saçılır. Yüksek infektivitedeki elementer cisimcikler, başka bir konakçıya tutunarak yeni bir döngüyü başlatır (31).




**Şekil 1**. *Chlamydia abortus*'un yaşam döngüsü (32).

### 2.3. Antijenik Yapısı

#### 2.3.1. Lipopolisakkarit (LPS)

Bakterinin antijenik yapısında bulunan lipopolisakkaritler ısıya dayanıklı lipoprotein karbonhidrat kompleksleridir. Hücre duvarının yapısında bulunur. *Chlamydiaceae* ailesinin tüm üyelerinin ortak bileşenidir. *Chlamydiaceae* ailesinin ELISA ve KFT gibi serolojik tanı testlerinde hedef antijendir (9).

#### 2.3.2. Major Dış Membran Proteini (MOMP)

Enfeksiyöz elementer cisimciklerin yüzeyindeki antijenik yapıdır. LPS ile birleşerek kompleks moleküler form oluşturur. MOMP, *omp*A genleri tarafından kodlanır. Bu genler VS1 - VS4 adlı segmentler içerir. Bu segmentler *C. abortus* ve *C. pecorum*'da birbirinden farklıdır. Bu bölgelere tür bazında spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak tespit yapılabilir (19). Major Dış Membran Proteini (MOMP), konakçı-patojen ilişkisinde, bakterinin korunma mekanizmasında önemli rol oynar (33).

#### 2.3.3. Polimorfik Dış Membran Proteinleri (POMP)

*C. abortus* S26/3 suşunun hücre zarında olduğu bilinmektedir. İnfeksiyöz elementer cisimciklerin yüzeyindeki antijenik yapıdır. 4 adet gen tarafından kodlanır.

POMP90 isimli 90 kda ağırlığındaki POMP‟un *Chlamydia abortus*‟un serolojik teşhisinde kullanılabileceği ifade edilmektedir (33).

### 2.3.4. Kazeince Zengin Dış membran Proteinleri

Ozmotik stabiliteyi artıran kompleks yapı oluşumunda rol oynarlar. Dış membran Proteinleri *Omp*3 ve *omp*2 genleriyle kodlanan A ve B proteinleridir (33).

### 2.3.5. Isı Şok Proteinleri

Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin dış membran kompleksinde bulunur. Bakterilerin değişen çevresel şartlara karşı hayatta kalmasındaki en önemli mekanizmalardandır. Isı şok proteinlerinin stres şartları altında transkripsiyonu tetiklemesi bakterilerin kısa zaman içerisinde yeni proteinler sentezlemesini sağlar. Isı şok proteinlerinin büyük moleküllerin oluşturulması ve ayrıştırılmasında, hücre içi transport mekanizmalarında, ve fonksiyonunu kaybetmiş moleküllerin parçalanmasında görev aldığı da ifade edilmektedir (33)

### 2.3.6. Glikolipid Antijenleri

Lipopolisakkaritin iç yapısında bulunan glikolipid antijenleri, enfeksiyon sonrası 48-72 saat sonra hücre kültürlerinde, embriyolu tavuk yumurtalarında elementer cisimciklerde görülmüşlerdir. klamidya'lar cinse spesifik glikolipid antijeni sentezlerler (33).

## 2.4. Epidemiyolojisi

### 2.4.1. Konakçı Dağılımı

*Chlamydia abortus* dünyanın birçok bölgesinde endemik seyreden koyun ve keçi abortlarının en önemli sebeblerindendir (34). Etken en fazla koyun ve keçileri etkiler, daha düşük miktarda da olsa sığırlarda, mandalarda, domuzlarda, atlarda, geyiklerde, lamalarda ve insanlarda enfeksiyona yol açar (35,36). Aynı zamanda etken evcil ve vahşi birçok diğer memeli türünde ve bazı sürüngenlerde (Kobay, tavşan, fare, yeşil deniz kaplumbağası, yılanlar ve kurbağadan) izole edilmiştir fakat hastalıkla direkt ilişkisi henüz kanıtlanmış değildir (12,13).

### 2.4.2. Enzootik Abortus'un Dünyadaki ve Türkiyedeki Durumu

Hastalık etkeni dünyanın birçok ülkesinde aborta yol açan ana etkenlerden biri olarak belirtilmektedir (37). Hastalık, Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'nın bazı bölgelerinde koyunlarda kuzu kaybının önemli nedenlerindendir (37,38,39,40,41). Kuzey Avrupa'da en önemli abort etkenidir. Birleşik Krallık"ta 1995-2008 yılları arasında infeksiyöz abort etkenleri arasında *C. abortus*"un oranı %44 olarak belirtilmiştir (39). İsviçre'deki koyunlarda *C.abortus'*un seroprevalansı % 19 olarak bildirilmiştir (40). İspanya'da Koyunların enzootik abortusu %56 ya kadar çıkmaktadır (41). Tunus Klamidyal abortların yüksek oranda görüldüğü ülkelerden biridir (40). Bulgaristan"da görülen küçük ruminant abortlarının %35.8 gibi çok yüksek bir oranının *C. abortus*"tan kaynaklandığı ortaya konulmuştur (42). Brezilya'da São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais ve Bahia eyaletlerinde keçiler de *C.abortus* % 12 olarak bildirilmiştir (43) Avustralya ve Yeni Zelenda ise hastalıktan aridir (39).

Türkiye'de hastalık ilk olarak Ataman ve Hakioğlu (1955); Yılmaz,S. (1962); tarafından KEA teşhis edilmiştir (44) Türütoğlu ve Erganiş (1996); koyun abort materyalinden %16.6 oranında izole edildiği bildirilmiştir (45). Duman ve Durak (1998); Konya bölgesinde koyunlardaki abort vakalarında serolojik çalışmalarda CFT ile %20 seropozitiflik ve %12.5 şüpheli sonuç bulmuşlardır (44). Güler ve ark (2006) 94 adet koyuna ait vaginal sıvap örneğinin 7"sinde (% 7.5) Klamidyal DNA tespit etmişlerdir (46). Çaya ve ark (2006) Güney Anadolu Bölgesinde yaptıkları çalışmalarda; *C. abortus* seropozitiflik oranlarını Kahramanmaraş"ta %30, , Mersin"de %23.5, Kilis"te %20, Osmaniye"de %9.5, Hatay"da %27,Gaziantep"te % 16.8, Urfa"da %16.7, Adana"da %2.5, Adıyaman"da %5, olarak tespit etmişlerdir (47). Gökçe ve ark (2007) Kars'ta yaptıkları bir çalışmada, abort görülen koyunlarda seropozitiflik oranını %13.9, sığırlarda ise %8.33 olarak bulmuşlardır. Otlu ve ark (2007) ise Kars'ta koyunlarda yaptıkları çalışmalarda seropozitiflik oranını %5.4 olarak belirlemişlerdir (48). Küçükayan ve ark. (2007) 2003 – 2007 yılları arasında Etlik Merkez Veteriner Kontrol Enstitüsüne gönderilen atık fetüs ve kan serumlarından yaptıkları çalışmada koyun kan serumlarından 2376"sının 43"ünde (% 1.8) Klamidyoz"a, 2635"inden 395"inde (%15) Bruselloz"a, 1296"sının 3"ünde (%0.23) Salmonelloz"a, 1746"sının 130"unda (%7,4) Kampilobakterioz"a, karşı antikor saptamışlardır (49). (Öztürk ve ark. (2016), Burdur'da koyunlarda yaptıkları çalışmalarda hastalığın seroprevalansını %32.0 olarak bulmuşlardır

(50). Kalender ve ark.(2013) Kuzey Anadolu'da kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile 64 koyun abort materyalinde, %9.8 oranında etken DNA'sını belirlemişlerdir (51). Karagül ve ark (2019) Düzce'de sürülerin seropozitiflik oranını %42,8 olarak belirlemişlerdir (52).

### 2.4.3. Etkenin Dayanıklığı

Hasta hayvanların dış ortama saçtıkları Elementer cisimcikler(EC), sonbahar ve ilkbahar aylarında günlerce, kış mevsiminde (donma ısısına yakın sıcaklıkta) ise aylarca canlı ve infeksiyöz olarak kalabilir (13,35). Elementer cisimcikler(EC) dışkı ve toprakta uzun süre canlılıklarını muhafaza eder (30,38).

Klamidia'lar otoklavda 121°C 'de 15 dakikada, 160°C – 170°C kuru sıcakta en az 1 saatte ölür. *C. pcittaci*"nin asit ve alkali dezenfektanlara dirençli olduğu bildirilmektedir. Bir çalışmada ise *Chlamydia trachomatis*"in %0.25- 2.5 sodyum hipoklorit, %70 etanol, %2 glutaraldehit, ortofitalaldehit, %7.5 hidrojen peroksit ve %0.2 perasetik asite asit ile inaktive edildiği belirtilmektedir (13).

Bazı antibiyotikler (eritromisin, tetrasiklin, klorofenikol), protein sentezini etkiler, Penisilin ,Sikloserin hücre duvarı sentezini sentezini bozması üremeyi durdurur. Bazı Chlamydia türlerinde de Sülfanamitler bakterinin üremesini durdurmaktadır (27).

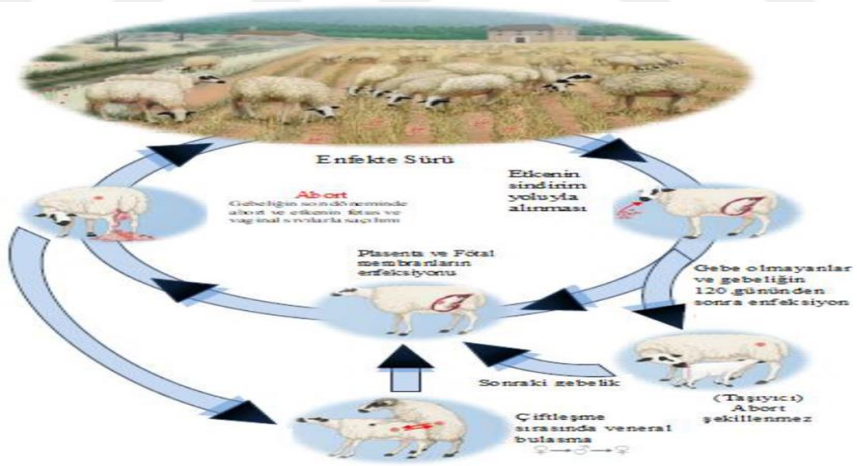
### 2.4.5. Enfeksyion ve Bulaşma

Koyun ve keçiler her yaş dönemi ve her mevsimde *C.abortus* ile infekte olabilirler. En yaygın enfeksiyon kaynakları aborte fetüsler, plasenta ve uterus akıntılarıdır. Etken vajinal sekresyonla 7-14 gün boyunca atılmaya devam eder (38). Kontamine olan çevre, kuzu ve oğlakların da enfeksiyona maruz kalmasına neden olmaktadır. Enfeksiyonun bulaşmasındaki etken, abort sırasında etrafa saçılan *C.abortus*'un elementer cisimleridir. Üst solunum yolları, göz ve sindirim kanalı etkenin giriş yolları olarak görülmektedir. (20) Enfeksiyona maruz kalan koyun ve keçilerde bakterinin kan yolu ile tüm vücuda dağıldığı bildirilmiştir. Etken gebe olmayan koyunların lenfoid dokularında latent formda bulunmaktadır. Bu dönemde saçılım; idrar ve dışkı yoluyla gerçekleşmektedir (38). İnfekte gebe koyun ve keçiler, yavrulama esnasında plasenta ve fötal sıvılar ile birlikte çevreye yüksek miktarda elementer cisimcik saçarlar. Koyunlarda etkenin saçılımı aborttan 24 saat önce vaginal akıntılarla başlar ve 2-3 hafta devam eder (12). Keçiler de ise etkenin (EB )saçılımı aborttan 2 hafta öncesinde

başlar ve 2 hafta sonrasına kadar devam eder. Abort sonrasında süt, idrar ve dışkıyla az miktarlarda etken uzun süre saçılabilir (37).

Enfeksiyon, anneden yavruya doğum sırasında doğum kanalından bulaşırsa infekte yavru ikinci gebeliğinde yavru atar. Enfeksiyonun yavruya uterusta kongenital yolla bulaşması durumunda, infekte yavru ilk gebeliğinde abort yapar (33). Yavru, persiste infekte ise abort yapmaz fakat etkeni sürü içerisinde veya sürüler arasında saçmaya devam eder (53).

Teankum ve ark ( 2007), tarafından yapılan bir çalışmada *C.abortus* koyunların semenlerinden izole edilmediği fakat sığırların testis, epididim ve semenlerinden izole edidiği bildirilmiştir. Dolayısıyla küçük ruminantlarda etkenin cinsel yolla bulaşmadığı büyük ruminantlarda ise bulaşmanın olduğu ifade edilmektedir. Daha önceki çalışmalarda ise Lozano (1986), aktaran Teankum ve diğerleri (2007) tarafından *C.abortus*'un koçlar da epididimitise neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca suni tohumlama için kullanılan dondurulmuş semende de etkenin canlı kalabildiği ve Storz ve ark. (1968), aktaran Teankum ve ark. (2007) bununla beraber çevreye yayılabileceği bildirilmektedir (54).




**Şekil 2**. *Chlamydia abortus*"un yaşam döngüsü (55)

Enfeksiyonun çeşitli bulaşma yolları vardır. Abort veya doğum yapmış infekte hayvanların; abort meteryali, vagianal akıntıları, dışkı gibi sekret ve ekstrektler ile kontamine yem veya suyun sindirim yoluyla alınması, etkenin diğer hayvanlara ve insanlara bulaşmasının nedeni olduğu belirtilmektedir. Abort yapmış ve kronik taşıyıcı

hayvanların dışkı,idrar ve az olmakla beraber sütünden etken bulaşabilir (12). Vahşi hayvanların (Karga, tilki gibi) etkeni sürüler arasında taşıması da bulaş yollarındandır (33).

### 2.5. Patogenez

Koyun ve keçiler *C. abortus*'la gebelik öncesi ve sonrası infekte olabilirler. Abort genellikle gebeliğin bitiminden 2-3 hafta önce meydana gelir (35). Abortun hangi gebelik döneminde gerçekleşeceği, etkenin enfeksiyon oluşturma zamanına göre değişmektedir. Enfeksiyon gebeliğin 30 – 120. günlerinde oluşmuşsa hayvan yavru atar, gebelik öncesi veya gebeliğin 120. gününden sonra oluşmuşsa bir sonraki gebeliğinde abort görülür (56).

Koyunlarda yapılan çalışmalar enfeksiyonun EB'lerin sindirim yoluyla alınmasından sonra konakçıda kan, lenf ve diğer organlar yoluyla yayıldığı,tonsillern ise ilk replikasyon bölgesi olduğunu göstermektedir (57). NAVARO ve ark.(2004) gebe koyunlarada,plesantomların hilumundaki hematom gelişiminin başlangıcının yaklaşık olarak gebeliğin 60. gününde meydana geldiği ancak gebeliğin 90.gününe kadar patolojik değişikliklerin meydana gelmediğini bildirmişlerdir (58). Hastalık yaklaşık 90. gününden itibaren ise *C.abortus*'un çok sayıda izole edilebildiği plasental lezyonlar olarak ortaya çıkar.Etken plasentanın. fötal korionik epitelyumunun trofoblast hücrelerinde lokalize olur. Zamanla çevredeki interkotiledonar membranlara yayılır ve nekrotik plasentite oluşur. Plasentanın atılamadığı durumlarda uterusta metrit gelişir. İkincil bakteriyel enfeksiyonun hayvanda kondisyon kaybına veya ölüme yol açabileceği düşünülmektedir (59). Gebe olmayan koyunlarda etken lenfoit dokuda latent formdadır (58). İnfekte hayvanlarda, *C.abortus*'un plasental dokularda kolonileştiği sonraki gebeliye kadar hiçbir klinik belirti göstermediği belirtilmiştir (59).

*C. abortus*"un patogenezinde rol alan virülens faktörlerden; spesifik lipopolisakkarit antijen (komplement fikzasyon antijeni); inflamasyonu uyarmakla birlikte konakçı savunma hücrelerinden etkenin gizlenmesini sağlar. Proteaz / proteozom benzeri aktivite faktörü (CPAF) ise etkenin T hücrelerince tanınmasını engeller. Bu eylemi konakçının major histokompatabilite kompleks (MHC) üretimi ile ilgili transkripsiyon faktörlerini azaltarak gerçekleştirir. Tip 3 sekresyon aparatı da vakuol

membranında bir oluk açarak patojenik ürünlerin konakçı hücre sitozolüne bırakılmasını sağlar (60).

### 2.6. Klinik Bulgular

Koyunların enzootik abortusu, plasentitis ve abortusla karakterize bulaşıcı infeksiyöz bir hastalıktır (38). Hayvanlarda abortlar başlayıncaya kadar herhangi bir klinik belirti görülmez. Gebeliğin son 2-3 haftasında infekte hayvanlarda yavru atmalar,ölü kuzu doğumları ve 48 saatten fazla hayatta kalamayan zayıf kuzu doğumları görülmektedir.Bazı infekte koyunlarda sağlıklı kuzular doğurabilir (59).

Hastalıktan etkilenen sürülerde abort oranını ilk yıl %25-90 arasında değişebilir. Abort yapan dişilerde metrit veya solunum sistemi enfeksiyonu görülebilir. Hayvanlarda devamlılık arz eden inatçı bir öksürük, artritis ve keratokonjuktivitis gibi komplikasyonlar gelişebilir (58).

*C.abortus*'la yeni infekte olmuş bir sürüde gebelerin %90'ı hastalıktan etkllenebilir. Hayvanların süt veriminde de azalmalar görülür. Yüksek abort oranı 2-3 yıl boyunca hastalık döngüsel bir nitelik kazanıncaya kadar devam eder. Sonraki senelerde sürüye yeni eklenen ve *C.abortus*'a bağışıklık geliştirememiş dişilerden dolayı abort oranı %10 lar seviyesinde kalır. Hayvanlar sonraki gebeliklerinde sorun yaşamazlar (54).

Aborte fetüslerin üzerini kırmızı-kahverengi bir eksudat kapladığı görülmektedir. Abdominal ve pleyral boşluklarında kanlı sıvı birikimi, dil ve ağız boşluğunda ise peteşiyel kanamalar görülür (62).

Sığırlarda, infekte sürülerde düzensiz aralıklarla östrus tekrarı, gebe kalma oranının düşmesi gibi klinik belirtiler de görülmektedir (63). Üreme çağındaki erkeklerde, vezikülit, epididimit ve orşit gözlenen klinik belirtilerdir (64).

### 2.7. Bağışıklık

*C. abortus* enfeksiyonlarında Immunglobulin M (IgM)) ve Immunglobulin G (IgG) immun yanıttan sorumludur. Antijene karşı ilk yanıt IgM tarafından verilir. IgM, organizmanın antijeni tanımasında rol alır. Bunun sonucu olarakta daha uzun ve güçlü bir immun yanıt oluşturulması sağlanır. IgM seviyesinin yüksek olması enfeksiyonun yeni

başlamış olduğunu gösterir. Yavru enfeksiyonu intrauterin dönemde aldıysa IgM seviyesi neonatal dönemde yüksektir. IgG yanıtı IgM yanıtından daha sonra gelişir. IgG yanıtı uzun sürelidir. IgG bağışıklığın temelini oluşturur. IgG spesifitesi daha yüksek olduğu için serolojik testlerde tercih edilir (65).

Klamidyoza karşı bağışıklık hastalığın geçirilmesi ve hayvanların aşılanması ile gerçekleşir. Hastalığı geçiren keçilerde bağışıklığın 3 yıl kadar devam ettiği görülmektedir. Fakat bu hayvanlar asemptomatik taşıyıcı oldukları için enfeksiyonu etrafa saçarlar (12).

### 2.8. Zoonotik Önemi

*C.abortus*, insan sağlığını etkileyen önemli zoonotik bakterilerdendir. İnfekte hayvanlarla yakın teması olan insanlar özellikle yavrulamanın olduğu dönemlerde etkeni sindirim ve solunum yoluyla alırlar (36).

Mezbahanede çalışanları, hayvan bakıcıları ve laboratuvar çalışanları da risk altındadır (63). Labaratuvar ortamında C. abortus ile infekte olmuş bir araştırmacıda solunum bulguları tespit edilmiştir. Hastalığa ateş, halsizlik, titreme, kuru öksürük, göğüs ağrısı ve nefes darlığı eşlik etmiştir (13).

*C.abortus* gebe kadınlar için ciddi enfeksiyonlara ve abortlara yol açar Kadınlar gebeliğin her döneminde enfeksiyona maruz kalabilirler. Bu vakaların çoğunda, kadınlar başlangıçta ateş, halsizlik, baş ağrısı, karın ağrısı, baş dönmesi, kusma gibi nonspesifik, grip benzeri semptomlarlar göstermişlerdir. Düşüklerin ise genellikle klinik belirtilerin başlamasından hemen sonra meydana geldiği ifade edilmiştir. Kadınların çoğunun septisemi, hepatit, böbrek disfonksiyonu, pnömoni ve yaygın intravasküler pıhtılaşma gibi komplikasyonlar gösterdikleri bildirilmiştir (66).Gebe kadınlarda C.abortus kökenli abort vakaları ilk defa 1967 yılında rapor edilmiştir. 1987-2000 yılları arasında C. abortus etkenin neden olduğu 20 insan abort vakası bulunmaktadır (67). İtalya'da hayvan abort materyalleriyle teması olan 32 haftalık hamile bir kadında septisemi görülmüş ardından abort gerçekleştiği bildirilmiştir (66). Almanya'da toplum kökenli pnömoni vakalarında da C. abortus, tespit edildiği bildirilmiştir ( 23).

Enfeksiyona maruz kalmış diğer insanlarda hastalık non-spesifi seyredebilir. Baş ağrısı, ateş, kusma gibi grip benzeri semptomlar görülebilir. Bu nedenle abort yapmış

hayvanlarla yakın temasta bulunulmamalıdır.Özellikle gebe kadınların hayvanlarla teması gerekiyorsa dezenfeksiyon tedbirleri alınmalıdır (22,23).

Etkenin zoonoz olması nedeniyle labaratuvar çalışanlarının da en az Biyogüvenlik düzeyi II laboratuvarda çalışılmaları gerekmektedir (68).

## 2.9 Teşhisi

Koyun enzootik abortusu birçok ülkede koyun ve keçilerde abortuslara sebep olan zoonoz karekterli enfeksiyöz bir hastalıktır. Hastalık ülkemizde ilk olarak 1956 yılında teşhis edilmiştir. Daha sonraki yıllarda araştırıcıların yürüttüğü bazı çalışmalarda hastalığın varlığı ve yaygınlığı kültür, serolojik metotlar ve moleküler metotlarla ortaya konmuştur. Hastalığın teşhisinde, kültür, serolojik testler; KFT, ELISA ve immunofloresan, immunoperoksidaz, DNA amplifikasyon (Konvansiyonel ve real-time PCR) ve DNA microarray yöntemleri kullanılmaktadır. Etken izolasyonu için genellikle embriyolu tavuk yumurtaları ve hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır.DNA amplifikasyon metotları, atık fötus ve vajinal swap örneklerinden C. abortus'un saptanması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (68).

### 2.9.1 Bakteriyel teşhis

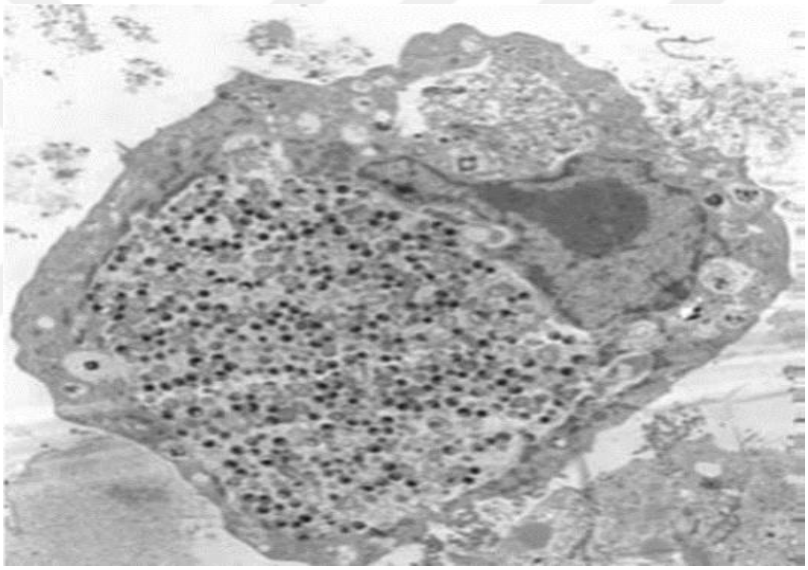
Hastalığın teşhisinde kültür ve etkenin izolasyon ve identifikasyonu altın standart olarak kabul edilsede, klinik metaryalin taşınmasında özel besiyerlerine ihtiyaç duyulması, etkenle çalışmanın oluşturduğuı enfeksiyon riski ve etkenin biyogüvenlik 2 seviyesinde çalışmalar gerektirmesi gibi dez avantajları vardır (69).

Koyun ve keçilerde gebeliğin son döneminde görülen abortlar, ölü ve zayıf yavru doğumları Enzootik abortus'u düşündürür. *C. abortus,* labaratuvara gönderilen marazi maddeler'den hazırlanan sürme preparatların boyanmasıyla teşhis edilebilir (58). İzolasyon için en uygun materyaller; Nekrotik kotiledon, plasental membranlar, fötal organlar ve vaginal sıvaplardır. İzolasyonun başlaması gecikecekse; marazi maddelerin taşıyıcı besiyerine alınarak -80°C veya -20°C de bekletilmesi gerekir. Sükroz/Fosfat/ Glutamat taşıyıcı besiyerleri tercih edilir (68).

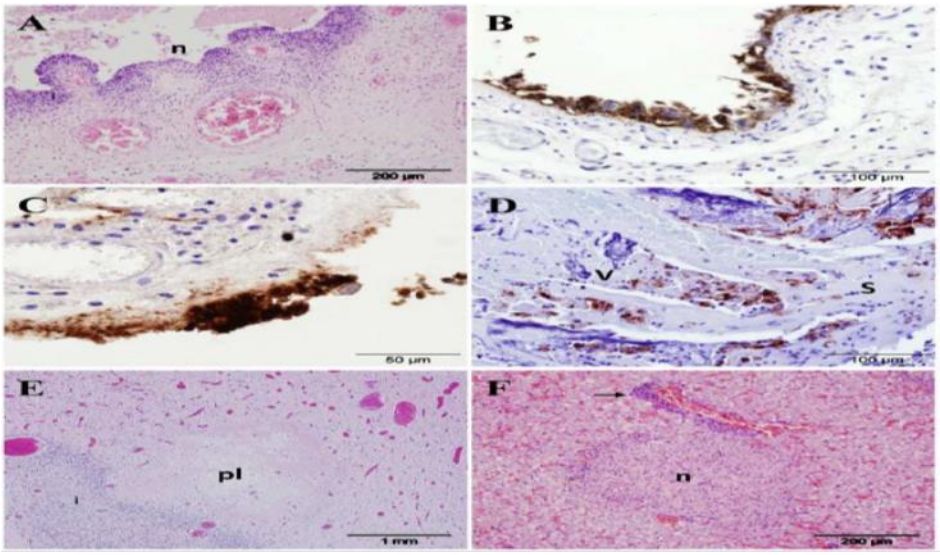
*C. abortus,* doku veya sıvaplardan yapılan boyalamalarla teşhis edilebilir. Plasental materyalin bulunamadığı durumlarda abomasum içeriğinden vajenden ve abort sonrası annesi tarafından temzilenmemiş fetus yüzeyinden alınan sıvaplar da etkenin

izolasyonunda kullanılır. Ancak plasental sıvaplara göre daha az sayıda etkeni içerirler Etkenin izolasyonunda bir çok farklı boyama yöntemi kullanılmaktadır. Giemza Machiavello, Stamp, Ziehl-Neelsen, Gimenez, Streptavidin- biotin boyama yöntemleridir Boyamalarda elementer cisimcikler kümeler halinde kırmızı renkte görülür (68).

İntrastoplazmik inkluzyon cisimleri dokulardan hazırlanan ince kesitlerin boyanmasıyla görülür. Ancak daha iyi sonuçlar almak için immunolojik boyalar (İmmunperoksidaz yöntemi ve streptovilin-biotin boyama yöntemi) kullanılabilir Szeredi ve Bacsadi (2002) yaptıkları bir çalışmada en doğru sonuçların immunohistokimyasal boyama metodu ile alındığını, en az tespitin ise stamp boyama ile yapıldığını bildirmiştir (69).



**Resim 1.** İnfekte hücrede inklüzyon cisimciği içerisinde elementer (koyu ve küçük) ve retiküler (soluk ve büyük) cisimcikler (60).




**Resim 2.** *C. abortus* enfeksiyonunda histopatolojik görünümler. (61)

Etken canlı hücrede üretilerek izole edilebilir. Bu amaçla çeşitli hücre kültürleri ve embriyolu tavuk yumurtası kullanılır. Hücre kültüründen yeni suşların tespitinde daha fazla faydalanılır. Etkenin zoonotik olması nedeniyle izolasyon ve identifikasyonunun biyogüvenlik düzeyi II laboratuvarlarda yapılmalıdır (52).

C. abortus'un izolasyonu için fötusun organ örneklerinden (karaciğer, dalak, akciğer ve mide) streptomisin içeren (200 µg/ml) nutrient buyyon içerisinde % 10'luk süspansiyon hazırlanır. Bu süspansiyondan6-8 günlük embriyolu tavuk yumurtalarının sarı keselerine inokulasyon yapılarak37°C lik etüvde 4-13 gün inkubasyona bırakılır. Embriyo ölümlerin görülmediği durumda iki kez kör pasaj yapılır. İnkübasyonun 4. Gününden sonra ölen embryoların yumurta keseleri toplanır ve sarı kesesi zarlarından preparat hazırlanarak stamp ve Gimenez boyama ile boyanır (70,F71). Abortus, hücre kültürlerinde de izole edilebilir. En fazla tercih edilenleri McCoy, Buffalo Green Monkey (BGM) ve baby hamster kidney (BHK) dir (67).

### 2.9.2. Moleküler Yöntemler

Konvansiyonel ve Real Time PCR, yüksek özgüllüğü ve standardizasyon kolaylığı (72) ve etkenin izolasyonuna gerek kalmadan doğrudan metaryalden tespitinin yapılması açısından son zamanlarda tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (68,73).

Konvansiyonel PCR metodu klamidial etkenlerin 16S-23S rRNA gen bölgelerini hedef alır (74).Bu metotlar RFLP analizi ile bir arada kullanılarak *C. abortus, C. pcittaci ve C. pecorum* ayırımı yapabildiği gibi enfeksiyon, aşı ayrımı da yapılabilmektedir (75).

Real time PCR yöntemleri, kolay standardize edilmesi, kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle hastalığın teşhisinde daha fazla tercih edilmektedir (72). Real Time PCR yöntemlerinde en çok *omp*A geni hedeflenmiştir. Bu gen bölgesi Klamidyal suşlar içerisinde en iyi ayrımın yapılabileceği gen bölgesidir. OİE tarafından önerilen Real Time PCR yöntemleri *omp*A genini hedef alarak tür spesifik teşhise imkan sağlamaktadır (76)

DNA mikroarray hidridizasyon testi de oldukça duyarlı bir teşhis metodudur. Materyalden direkt ve hızlı teşhis yapma imkanı sunar. Bu yöntem tek seferde 9 farklı Chlamydia türünün ayrımı yapılabilmektedir (77).

### 2.9.3. Serolojik Testler

*C.abortus* infeksiyonunun teşhisi için direkt vet indirekt yöntemler kullanılmaktadır (78). Serolojik testler indirekt tanı testleri olarak bireysel bazda karar vermeden ziyade sürü taramasında önemlidir. Serolojik testler C.abortus'un kültür yöntemi ile teşhisindeki dezavantajlardan dolayı en sık başvurulan yöntemlerdendir (23).

Komplement fiksasyon testi (KFT), Koyunların enzootik abortusunu (KEA) saptamak için yaygın olarak kullanılan serolojik testlerden biridir. Fakat, bu testin standardizasyonunun güç olması, *Chlamydia pecorum* ve *Acinetobacter spp*. gibi bazı gram negatif bakterilerle kros-reaksiyon vermesi KFT'nin sensitivite ve spesifitesini düşürmektedir (79). Bunun nedeni Chlamydiaceae familyasının tüm üyeleri için ortak olan ve bazı Gram negatif bakterilerin antijen yapısında bulunan lipoprotein karbonhidrat kompleksi (LPS)'dir. KFT spesifik bir test olmasına rağmen diğer serolojik testlerden daha az duyarlıdır (80). KFT testinin abort sonrası antikor yanıtın en yüksek seviyelere ulaştığı üçüncü ve altıncı haftalar arasında yapılması önerilir. Serumlar, 1/32 ila 1/512 arasındaki dilüsyonlar ile test edilir. KFT titreleri, %50 veya daha az hemoliz veren en yüksek serum dilüsyonu olarak ifade edilir (%50 hemoliz 2+, %0 hemoliz 4+ olarak derecelendirilir) 1/32 veya daha büyük bir dilüsyonda 4+ titrenin pozitif olduğu varsayılırken, 1/32'lik bir seyreltmede 2+ titrenin şüpheli olduğu kabul edilir (81). 1/32'den düşük titreler *C.abortus* için non-spesifik kabul edilmelidir. Düşük oranda

enfeksiyon da bu titrelere sebep olabilir. Şüpheli sonuçların Wester-Blot ile doğrulama yapılması gerekmektedir (80).

İndirekt mikroimmunofloresans metotuyla *C. abortus* ve *C. pecorum* arasındaki antikor yanıtı ayırt edilebilse de bu metot rutin teşhiste kullanılamayacak kadar zaman alıcıdır (82).

(Salti-Montesanto ve ark. 1997) Monoklonal antikor teknolojisiyle üretilen kompetatif ELISA ve (Longbottom ve ark, 2002) rekombinant antijen teknolojisi içeren indirekt ELISA metotlarının sensivite ve spesivitesi KFT‟ye göre daha yüksek olduğunu bildirmektedir. (Gerber ve ark, 2007) Serolojik teşhis metotlarının, infekte hayvanlarla aşılı hayvanları ayırt edemediğini ifade etmektedirler (47).

Farklı özgüllükler ve hassasiyetler göz önünde bulundurularak her tanısal problem için uygun bir ELISA seçilmesine özen gösterilmelidir. LPS veya EB antijen bazlı ELISA'lar, C. pecorum ve C. abortus ile infekte olmuş hayvanlar arasında ayrım yapamaz, ancak CF testi ile karşılaştırıldığında EAE için daha hassas birincil tarama testleri olduğu kanıtlanmıştır (80).

Anti C. abortus antikorlarının spesifik tespiti, Salti-Montesanto ve ark (1997) MOMP, rekombinant MOMP , Longbottom ve ark (2002) veya POMP 90 sentetik peptitlerine dayanan ELISA'ların kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir. Wilson ve ark (2009) Son zamanlarda, POMP90'a dayalı yeni bir dolaylı ELISA testi ticarileştirildi ve özellikle C. pecorum ile infekte olmuş hayvanların ayırt edilmesinde C. abortus için hem duyarlı hem de spesifik olduğu gösterildi (34).

### 2.10. Tedavi ve Kontrol

Hayvanların ilk olarak C.abortus infeksiyonundan korunması ve hastalığın kontrolü amaçlanmalıdır. Bu amaçla hastalık etkeninin sürü içinde yayılması sınırlandırılmalıdır. Hastalığı teşhis edilmiş, abort yapmış hayvanlar sürüden uzaklaştırılmalıdır. Plasenta, aborte fetus gibi infekte materyaller imha edilmeli, doğum alanlarının etkili dezenfektanlarla dezenfekte edilmesi sağlanmalıdır. Hastalığın görülmediği sürülere, Klamidyoz geçmişi olmadığı bilinen sürülerden dişi hayvan alımı yapılmalıdır. Böylece latent infekte hayvanların sürüye katılması önlenerek, sürünün infekte olması engellenir (81).

Tedavide tetrasiklinler etkenin çoğalmasını sınırlayıp abortları önlemede etkilidirler fakat etkenin saçılımını engelleyemezler. Gebeliğin 105 ve 120. günlerine 20 mg/kg dozunda kas içi yolla oksitetrasiklin uygulamasının abortları önlediği belirtilmiştir (37,81). Gebeliğin 100. gününden sonra 10-14 gün aralıklarla doğuma kadar oksitetrasiklin enjeksiyonlarının tekrarlanması önerilmektedir. Salgın durumlarında ise sürünün tamamına oksitetrasiklin uygulaması yapılması yavru kayıplarını azaltır fakat infeksiyonun ortadan kalkmasını sağlamaz. Ayrıca infeksiyon plasentada ciddi hasara neden olduğu için az sayıda da olsa abortlar devam eder (40). Antibiyotik uygulamalarının tekrarlanması antibakteriyel direnç gelişimine neden olabileceği için sadece acil durumlarda tercih edilmelidir (60). Abortların önlemesi ve bakteri saçılımının engellemesi için tavsiye edilen koruma yöntemi aşılamadır (37).

# 3.GEREÇ ve YÖNTEM

## 3.1.Gereç

### Referens Bakteriyel Suş

Çalışmada Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında mevcut bulunan Moredun Enstitüsü Dr. Longbottom'dan temin edilen *C.abortus* S26/3 suş embryolu tavuk yumurtasında üretilmek ve bundan antijen yapmak için kullanıldı.

### Referens Pozitif ve Negatif Serum Örnekleri

Çalışmada Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü (SVKE) Seroloji laboratuvarına, Samsun ili ve çevre illerden atık etkenlerinin tanısı amacıyla gönderilen serumlar kullanıldı. Bu serumlar gerek yeni geliştirilen ve gerekse ticari (IDEXX Chlamydophila abortus Antibody Test Kit) kit ile eşzamanlı test edilerek iki test arasındaki uyum saptandı. Yeni geliştirilen ELISA'nın özgüllük ve duyarlılığının ve eşik değerinin saptanması için atık yapan hayvanın fötal dokularından (karaciğer, dalak, mide içeriği) yapılan PCR ile KEA yönünden pozitif bulunan koyunlara ait 20 adet pozitif ve daha önce klamidyoz görülmemiş ve serumları ticari ELISA ile negatif bulunan koyunlara ait 30 adet negatif serum kullanıldı.

**ELISA İçin Kullanılan Solüsyonlar**

**Antijen Saplama Solusyonu**

| | |
|---|---|
| Sodyum hidrojen karbonat | 2,93 g |
| Sodyum karbonat | 1,59 g |
| Distile su | 1 litre |

Hazırlanan solusyonun pH değeri 9.6 olarak ayarlandı ve 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

**Dilüsyon Tamponu**

| | |
|---|---|
| Di-sodyum hidrojen ortofosfat | 1,4 g |
| Sodyum klorid | 7,0 g |
| Potasyum klorid | 0,2 g |
| Potasyum di hidrojen fosfat | 2 g |
| Tween 20 | 1 ml |
| Fenol red (%1 w/v) | 1 ml |
| Distile su | 1 litre |
| pH | 7.3 |

**Bloklama Solüsyonu (% 5 BLOTTO)**

| | |
|---|---|
| PBS | 500 ml |
| Süt tozu (yağsız) | 5 gr |
| Tween 20 | 500µl |

**Substrat Solüsyonu (fosfat-sitrat buffer, pH 5.0)**

| | |
|---|---|
| Dibazik Sodyum Sitrat | 0.2 M |
| Sitrik Asit | 0.1 M |
| O-Phenlyenediamine Dihydrochlorine | 40 mm |
| %30 $H_2O_2$ | 4 mm |

**Yıkama Solüsyonu**

| | |
|---|---|
| Di sodyum hidrojen ortofosfat | 0.14 gr |
| Tween-20 | 1 ml |
| Distile su | 10 litre |

### 3.2.Yöntem

**Embriyolu tavuk yumurtasına ekim**

Harran Üniversitesi Veteriner fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında mevcut bulunan Moredun Enstitüsü Dr. Longbottom'dan temin edilen *C.abortus* S26/3 suşu antijen hazırlamada kullanıldı. Liyofilize haldeki *C.abortus* S26/3 suşu Steril PBS ile sulandırıldıktan 0,2 ml miktarında 6-8 günlük 10 adet embryolu tavuk yumurtalarının sarı keselerine inokulasyon yapılarak 37°C'de 4-13 gün inkubasyona bırakıldı. Ölüm görülmeyen embryoların sarı keselerinden hazırlanan solusyon 0.2 ml olarak tekrar embryolu tavuk yumurtasının sarı kesesine inoküle edildi. Bu şekilde 2. pasajdan sonra inkübasyonun 4. günü ve sonrasından sonra ölen embryoların vaskularize olmuş yumurta keseleri toplandı. Sarı kesesi zarlarından preparat hazırlanarak Stamp boyası ile boyanarak yeşil zeminde küçük kırmızı elementer cisimciklerinin bolca görüldüğü infekte sarı keseler, antijen olarak hazırlanıp kullanılmak üzere -20°C de muhafaza edildi.

**PZR**

Çalışmada atık yapan hayvanın fötal dokularından (karaciğer, dalak, mide içeriği) yapılan PCR ile KEA yönünden pozitif bulunan koyunlara ait serumlar gerçek pozitif serum olarak kullanılacağından, bu fötal dokulardan elde edilen genomik DNA konvansiyonel PCR ile amplifiye edildi. Bu amaçla atık yavru mide içeriği ve iç organlar steril bisturi ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra doku ekstraksiyon kiti (QIAamp DNA mini kit, Qiagen, Germany) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılarak total genomik DNA elde edildi. Ardından konvansiyonel PCR yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 12,5 µl mastermix, 1,0 µl primer karışımı ( **Cabo-F AAT CAT CTA TCA TTG TAC GC 299 23S rRNA** Cp. abortus ve **Chuni4-R AGA CTA GGT TTC ACG TGT CTA G 23S rRNA** Chlamydiacae), 10 µl PCR grade su, 2,0 µl template DNA kullanılarak hazırlanan 25 µl PCR karışımı DNA amplifikasyonu için 95 °C de 5 dakika denaturasyonun ardından 94 °C de 15 sn, 60°C de 30 saniye ve 72 °C de 30 sn olan 35 döngü olarak gerçekleştirildi. Son siklus 72°C de 7 dakika ekstansiyon aşamasından oluştu. PZR'de amplifiye edilen DNA, % 2 lik agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutuldu. Jel hazırlanırken içine ethidium bromide (0.5 µg/ml) koyuldu. Elektroforez tampon solüsyonu olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) kullanılarak bir midi jel elektroforez tankında 70 voltta 1 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Daha

sonta sonuçlar ultraviyole ışığı altında değerlendirilerek 299 bp uzunluğundaki bant *C. abortus* yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

**ELISA antijeninin hazırlanması**

İnfekte yumurta sarı keseleri (-20°C de muhafaza edilen) 1 kısım yumurta sarı kesesi ve 2 kısım % 30(w/v) sukroz solüsyonu olamak üzere homojenize edildi. Daha sonra 12.000Xg de, 4 °C de 60 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatant ve yağ kısmı atıldı. Sediment 50 PBS solüsyonunda (pH 7.0) süspanse edildi. Daha sonra üzerine 20 gram steril diatom toprağı konuldu. 500 g de santrifüj edildikten sonra sediment ve yağ tabakası atıldı. Üstte bulunan süpernatant antijen olarak kullanıldı.

**İndirekt serum ELISA prototipinin geliştirilmesi**

İçinde yoğun elementer cisimcikler görülen infekte sarı keselerden hazırlanan homojenattan hazırlanan antijen kullanılarak indirekt ELISA, Vanzini ve ark.(15) bildirdiği yönteme göre bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Kullanılacak antijen ve konjugatın optimum dilüsyonları belirlendi.Bunun için karşılıklı titrasyonları yapılacak ve pozitif ve negatif serum arasında en büyük farkı oluşturan dilusyon optimum olarak seçildi.Hazırlanan ELISA solid faz antijenleri, 0.05M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solusyonu içinde, konsantrasyonu antijen ve konjugat dilusyonlarının optimizasyonunda belirlenen oranda sulandırıldı. Sulandırılan antijen 96 gözlü düz tabanlı polistiren pleytlerin (NUNC 692620) tüm kuyucuklarına 100 µl olarak taksim edildi. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler 4 ºC de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra pleytler % 0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) ile 2 kez yıkandı. Daha sonra pozitif ve negatif kontrol serumları PBS/T içinde 1:100 oranında sulandırılarak 100 µl olarak ve her test serum numunesinden üçer kez olmak üzere pleytlere konuldu. Pleytlerin üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile inkübasyonları yapıldı. Pleytler 3 kez yıkandıktan sonra horse radish peroxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini (Pierce 32490) belirlenen dilüsyonda PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler 4 kez PBS/T ile yıkanarak ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu (pH 5.5) içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H2O2) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra için her kuyucuğa 100 µl 4 N $H_2SO_4$ ilave

edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Negatif serum OD.lerin ortalaması artı 3 standart deviasyon (SD) ELISA eşik değeri olarak belirlendi. Geliştirilen ELISA prototipinin duyarlılığı,(Gerçek Pozitif Sayısı)/(Gerçek Pozitif Sayısı+Yanlış Negatif Sayısı) X 100 ; özgüllüğü (Gerçek Negatif Sayısı)/(Gerçek Negatif Sayısı+Yanlış Pozitif Sayısı) X 100 formülleri ile hesaplandı.

**İstatiksel Analiz**

Tanısal duyarlılık ve özgüllük ve kappa değeri Medcalc software programı kullanılarak yapıldı.

# 4.BULGULAR

Çalışmada Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü (SVKE) Seroloji laboratuvarına, Samsun ili ve çevre illerden atık etkenlerinin tanısı amacıyla gönderilen serumlar gerek yeni geliştirilen ve gerekse ticari (IDEXX Chlamydophila abortus Antibody Test Kit) kit ile eşzamanlı test edilerek iki test arasındaki uyum saptandı. Kappa değeri 0, 95 bulunarak iki test arasındaki yüksek düzeyde uyum saptandı. (Kappa değerinin 0-1 arasında olması, iki test yönteminin test sonuçları arasında daha iyi tutarlılık anlamına gelir. Kappa değeri 0,8'den büyük olduğunda genellikle kullanılan test yöntemlei arasında büyük bir oranda tutarlılık olduğu kabul edilir). Sonuçlar Tablo. da gösterildi.

**Tablo 1:** Home made ELISA ve ticari ELISA arasındaki uyum, özgüllük, duyarlılık ve doğruluk sonuçları.

| | | **İDEXX Chlamydia abortus antikor kiti İndirekt ELISA sonuçları** | | **Toplam** |
|---|---|---|---|---|
| | | **Pozitif** | **Negatif** | |
| **In house Chlamydia abortusAntikor indirekt ELISA sonuçları** | Pozitif | 85 (a) | 2 (b) | 87 (a+b) |
| | Negatif | 7(c ) | 135 (d) | 142 (c+d) |
| **Toplam** | | 92 (a+c) | 137 (b+d) | 229 (a+b+c+d) |

**Duyarlılık** % = a / (a+c) x 100

85/92X100=%92,4

**Özgüllük** %= d/ (b+d) x100

135/137X100=%98,5

**Doğruluk** % = (a+d) / (a+b+c+d) x 100

88/91X100=%96,0

**$P_0$=** (a+d) / (a+b+c+d)

220/229=0,96

**Pe=** ((a+b)(a+c) +(a+b)(b+d)) /(a+b+c+d)²

87x92+87X137/229$^2$

8004+11919/52441=0,38

**Kappa=** $\frac{(P_0-P_e)}{(1-p_e)}$

0,97-0,38/0,62=0,95

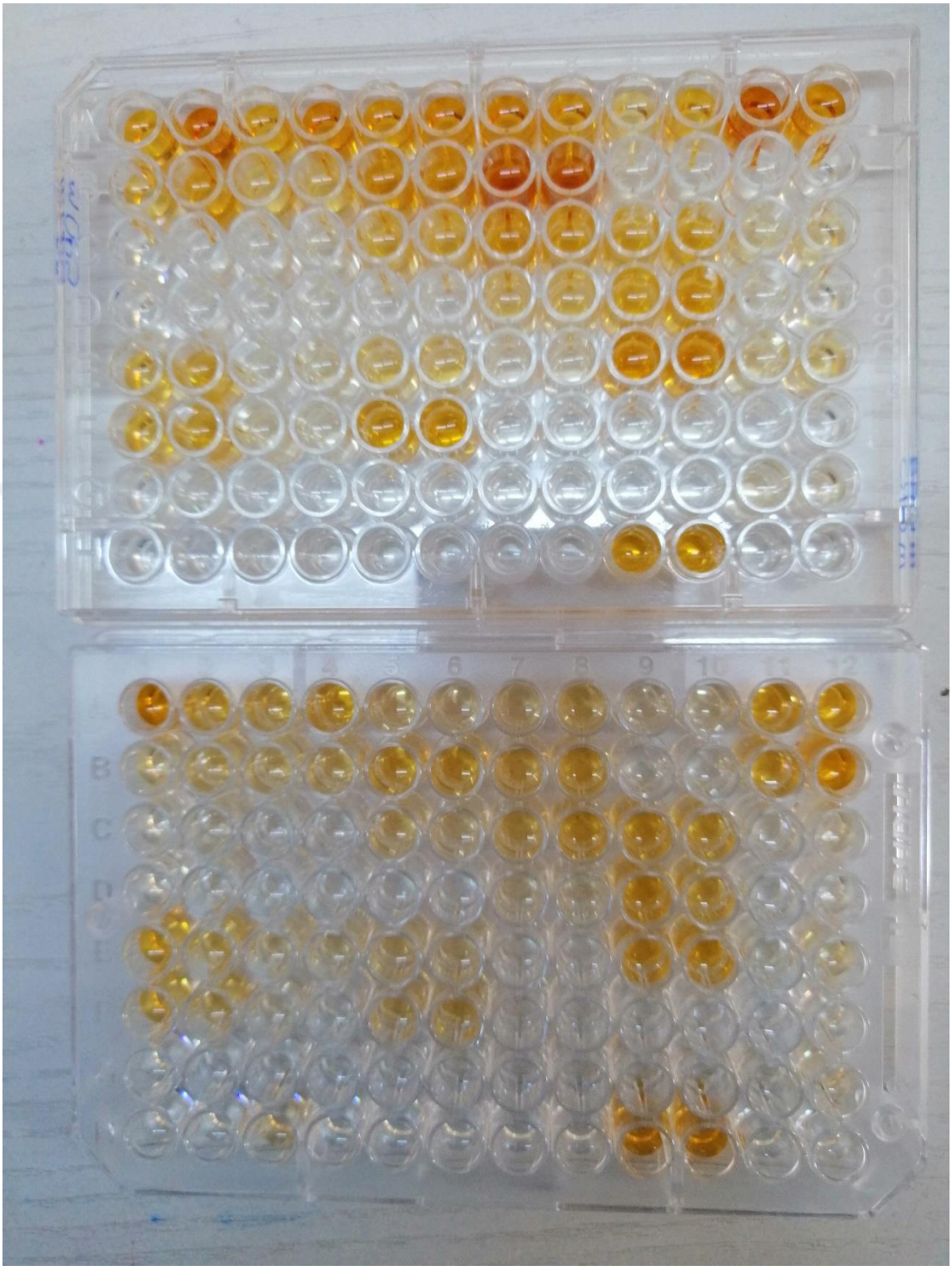
Yeni geliştirilen ELISA'nın özgüllük ve duyarlılığının ve eşik değerinin saptanması için atık yapan hayvanın fötal dokularından (karaciğer, dalak, mide içeriği) yapılan PCR ile KEA yönünden pozitif bulunan koyunlara ait 20 adet pozitif ve daha önce klamidyoz görülmemiş ve serumları ticari ELISA ile negatif bulunan koyunlara ait 30 adet negatif serum kullanıldı. Yeni kit 20 pozitif test serumundan 18 tanesini pozitif ve 30 negatif serumdan 29 tanesini negative bularak aşağıdaki formül kullanılarak tanısal duyarlılık %90 ve tanısal özgüllük %96.6 olarak saptandı.

Tanısal duyarlılık

(Gerçek Pozitif Sayısı)/(Gerçek Pozitif Sayısı+Yanlış Negatif Sayısı) X 100

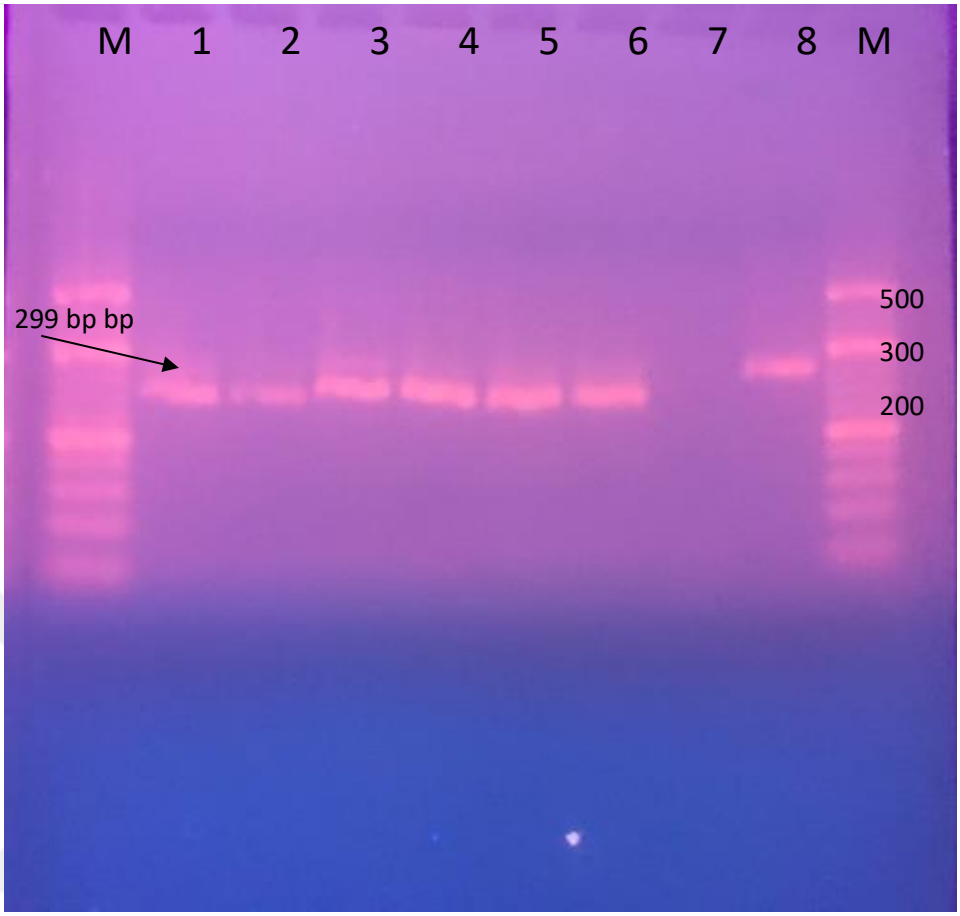
Tanısal özgüllük

(Gerçek Negatif Sayısı)/(Gerçek Negatif Sayısı+Yanlış Pozitif Sayısı) X 100



**Şekil 1.** Yeni geliştirilen ELISA prototipi ile alınan sonuçlar

**PCR**




**Şekil.2 M.** Marker 1. Pozitif kontrol 2-6. ve 8. pozitif kontrol serumlarının elde edildiği abort yapmış koyunların C.abortus PZR sonuçları 7. Kuyucuk negatif kontrol

# 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Abortla ilişkili fetal ölüm, finansal kayıplar ve halk sağlığı sorunları nedeniyle sadece Türkiye'de değil tüm dünyada önemli bir sorundur (33,48,51,82). Türkiye'de abort vakaları öncelikle brusellozun bir sonucu olarak meydana gelmektedir; bununla birlikte klamidyal abortus da hayvancılıkta abortusların en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (49,50). Bu açıdan enzootik abortus hastalığı göz önüne alındığında, sürülerdeki enfekte ve taşıyıcı hayvanların belirlenmesinde düzenli serolojik tarama oldukça faydalı bir araçtır (33,48,83,84).

Çeşitli sürveyans çalışmaları, Otlu ve ark. 2007 (83), Kalender ve ark. 2013 (51), Öztürk ve ark 2016 (50), Karagul ve ark 2019 (52), Malal ve ark. 2020 (33) son yirmi yılda Türkiye'de çiftlik hayvanlarında hastalığın yaygınlığını ortaya koymuştur.

Ülkemizde çeşitli illerde ve farklı yıllarda yapılan serolojik çalışmalarda %1.82 ile %32.0 arasında seropozitiflikler bulunmuştur. Duman ve Durak (1998) tarafından Konya ilinde atıklardan KFT testi ile yapılan çalışmada %20.0 seropozitiflik tespit edilmiştir. Çaya ve arkadaşlarının 2006 yılında Akdeniz ve Güneydoğu bölgesindeki illeri kapsayan çalışmalarında sırasıyla; Adana‟da %2.5, Osmaniye‟de %9.5, Hatay‟da %27.0, Mersin‟de %23.5, Kilis‟te %20.0, Adıyaman‟da %5.0, Kahramanmaraş'ta %30.0,Şanlıurfa‟da %16.7, Gaziantep‟te %16.8, oranlarında seropozitiflik saptanmıştır. Gökçe ve ark (2007) tarafından Kars ilinde yapılan çalışmada abort yapan koyunlarda %13.9 ve sığırlarda %8.33 oranında seropozitiflik saptanmıştır. Otlu ve ark (2007)'da Kars'ta abort yapan koyunlarda yaptıkları çalışmada seropozitiflik oranını %5.4 olarak bulmuşlardır. Küçükayan ve ark (2007) Etlik Merkez Veteriner Enstitüsü'nün sorumluluk alanına giren İç Anadolu Bölgesindeki illerden gelen atık fetüs ve kan serumlarıyla yaptıkları çalışmada Klamidiyozis'a karşı antikor oranını %1.8 olarak bulmuşlardır. Öztürk ve ark (2016) Burdur ilinde ELİZA ile koyunlarda yaptıkları seroprevalans çalışmalarında %32.0 olarak bulmuşlardır. Karagül ve ark (2019) Düzce ilinde ile Malal ve ark (2020) Marmara bölgesinde yaptıkları serolojik çalışmalarda *C. abortus*‟un seroprevalansını sırasıyla %20.8 ve %25.81 olarak belirtmişlerdir (33).

Genel olarak, elde edilen yüksek yüzdeler, duyarlı konakçıların patojene maruz kalmasını gösterir. *C. abortus*'un neden olduğu abortus fırtınalarını azaltabilmek için bölgesel önlemler ve olası eradikasyon programları için bu durum dikkate alınabilir (33).

Paylaşılan çalışmaların hepsinde yurt dışı orjinli ticari kitler kullanılmıştır. Aslında söz konusu tespit, hayvan sağlığında teşhis hizmetleri için muadil yerli kit ihtiyacını da ortaya koymaktadır. Mevcut çalışmada olduğu gibi sahayı temsil eden serum örnekleri ile validasyonu yapılan ve yüksek teşhis doğruluğuna ulaşan prototip ürünler, ülkesel ve ülkesel ve bölgesel kapsamda daha elverişli ve ekonomik teşhis araçları olarak kullanılabilecektir.

Teşhis kitlerinin seroprevalans araştırmalarında yaygın kullanımı haricinde klamidyal enfeksiyonların serolojik teşhisinde kullanılan ticari kitlerin teşhis limitlerini araştıran çalışmalar da yapılmıştır. Tür spesifik peptid temelli veya antijen olarak elementer cisimciklerin kullanıldığı ticari kitler karşılaştırılmış ve farklı özgünlük ve duyarlılık değerleri ortaya konulmuştur (85). Mevcut çalışmamızda da elementer cisimcik temelli bir yaklaşım takip edilmiş ve kayde değer özgünlük ve duyarlılık değerlerine ulaşılmıştır. Bununlu birlikte (EC) temelli test metodojilerinde *C.pecorum* kaynaklı çapraz reaksiyon ihtimali her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla birlikte *C.pecorum* etkeninin seropozitif hayvanlarda qPCR ile tespiti de ayırıcı kesin teşhis aşamasını alternatif sunarak desteklemektedir. (85).

*C.abortus* enfeksiyonunun koyunlarda teşhisinde aralarında 3 farklı ticari kitin bulunduğu 8 serolojik analizin karşılaştırmalı çalışmasında; ticari kitlere kıyasla rekombinant protein temelli in-house testler ile daha yüksek özgünlük ve duyarlılık değerlerine ulaşılmıştır (86). Ancak geliştirdiğimiz prototipde antijen olarak tüm bakteri kullanıldığından, (LPS) başta olmak üzere yüzeysel antijenler antikorların temel hedefi olacaktır. Bu durum rekombinant antijenlerin kullanıldığı ELISA formatlarına göre mevcut prototipimizde daha düşük duyarlık ve özgüllük değerine sahip olabilir. Ancak hastalığın sürü taramaları için çok daha ekonomik bir alternatif sunmaktadır.

Bu çalışmada antijen olarak Moredun Enstitüsü Dr. Longbottom'dan temin edilen *C.abortus* S26/3 suşu embryolu tavuk yumurtasında üretilmiş ve sonrasında antijen eldesi için kullanılmıştır. İçinde yoğun elementer cisimcikler görülen infekte sarı keselerden hazırlanan homojenattan yöntem bölümünde belirtildiği üzere antijen hazılanmıştır

Bu çalışmada homemade ELISA prototipinin tanısal duyarlılık ve özgüllüğünü %95 güven eşiğinde belirlemek amacı ile, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü (SVKE)

Seroloji laboratuvarına, Samsun ili ve çevre illerden gönderilen atık yapan hayvanların fötal numunelerinin C.abortus yönünden yapılan PZR ile pozitif olarak teşhis edildiği hayvanların serumu (20 adet) pozitif kontrol için kullanıldı. Daha önce klamidyoz görülmemiş ve serumları ticari ELISA ile negatif bulunan koyunlara ait 30 adet serum negative kontrol olarak kullanıldı. Buna göre duyarlılık (sensitivite) % 90[%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%80.36-99.9)] ve özgüllük (spesifisite) %96,6[%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%85.16-99.47)] olarak saptandı.

ELIZA testlerinde validasyon için farklı metod karakteristiklerinin tespit edilmesi tavsiye edilmektedir. Ortaya konması tavsiye edilen özellikler arasında; özgünlük, tespit limiti, duyarlılık, kesinlik, tekrar edilebilirlik, tekrar üretilebilirlik ve dayanıklılık karşımıza çıkmaktadır (87) Bu çalışmada özgünlük, duyarlılık ve doğruluk parametreleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

Enfekte hayvanların sürüden uzaklaştırılarak sağlıklı hayvanlarla ikame edilmesi; meradaki bulaşmayı, patojenin yayılmasını, ekonomik kayıpları ve halk sağlığı riskini azaltırken, kontrol ve eradikasyon programlarının oluşturulması açısından oldukça önemlidir (33,83). Düzenli serolojik tarama olmadan hastalıktan ari sürüleri idare etmek veya sağlıklı sürüler oluşturmak mümkün değildir (33). Bu kapsamda sahada sirküle olan suşlara karşı gelişen antikor tespiti özgünlüğü ve duyarlılığı yüksek testler ile devam ettirilmelidir. Bu çalışmada Samsın ili ve çevre illerden SVKE'ne atık etkenlerinin serolojik tanısı için gönderilen toplam 229 serum ticari bir ELISA kiti ve yeni geliştirilen prototip ELISA ile test edildi. Sonuçlar mukayeseli olarak karşılaştırıldığında iki test arasındaki uyum kappa değeri 0,95 bulunarak iyi bir uyum olarak değerlendirildi..Dolayısı ile seropozitivitenin saptanmasında ticari kit ile kıyasladığında çalışmada geliştirilen prototoip fazlasıyla kabul edilebilir sonuçlar sunmuştur. Sonuç olarak, Kitin söz konusu teşhis potansiyeli, klamidyal abort hastalığına karşı mücadelede karar vericilere ve ilgili sağlık otoritelerine daha ekomik ve pratik bir test avantajı sunmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR


1. Kılıç A, Doğancı L. Chlamydia Cinsi Bakteriler. Türk Mikrobiyol Cem Dergi 2003;(Chlamydia Cinsi Bakteriler):365–76.
2. GÜLER E. Koyunlarda ve Sığır'larda Chlamydia enfeksiyonları ve Türkiyedeki Durumu Etlik Vet, Mikrobiyo Derg. l988, 6(2) 167-187.
3. Moulder JW. The Relation of the Psittacosis Group (Chlamydiae) to Bacteria and Viruses. Annual Review of Microbiology 1966 20; 107–130.
4. Omsland, Anders, Sager J, Nair V, Sturdevant DE, Hackstadt T Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of Chlamydia trachomatis in an axenic medium. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109.48: 19781-19785.
5. Jones RB, Batteiger B. Chlamydial Diseases. Principles and Practice of Infectious Diseases 5th Ed, Churchill Livingstone, Philedelphia, 2000; 1986.
6. Kömeç S. Gebe Kadınlarda Klamidya Enfeksiyonu Seroprevalansı. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erzurum 2013.
7. Özbal Y. Klamidyalar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Birinci Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi 1999. s.705.
8. Wittenbrink MM, Mrozek M, Bisping W. Isolation Of Chlamydia Psittaci from a Chicken Egg: Evidence of Egg Transmisson. J. Vet. Med. B. 1993 40, 451-452.
9. Everett KDE. Chlamydiae and Chlamydiales: More Than Meets the Eye. Veterinary Microbiology 2000, 75, 109-126.
10. Schachter J, Stephens RS, Timms P, Kuo C, Bavoil PM, Birkelund S et al. Radical Changes to Chlamydial Taxonomy are not Necessary just yet. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001.
11. Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM. Divergence without Difference. Phylogenetics and Taxonomy of Chlamydia Resolved. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2009, 55, 115–119.
12. WEB_1. (2017). The Center for Food Security and Public Health internet sitesi. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/chlamydiosis.pdf, 23.12.2019.
13. CFSPH ve IICAB Zoonotic Chlamydiae Maintained in Mammals; Chlamydiosis 2017;

1-14. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/chlamydiosis.pdf
14. Özbey G, Kalender H, Muz A. Avian Klamidiyozis. FıratÜniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi 2008, Cilt 22, Sayı 1, s. 041-048.
15. Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy H, et all. Evidence for the Existence of Two New Members of the Family Chlamydiaceae and Proposal of Chlamydia Avium Sp. Nov. and Chlamydia Gallinacea Sp. Nov. Systematic And Applied Microbiology 2014, 37, 79–88.
16. Vorimore F, Hsia RC, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A et all. Isolation of a New Chlamydia Species from the Feral Sacred Ibis (Threskiornis aethiopicus): Chlamydia ibidis. Plos One 2013, 8, e74823.
17. Laroucau K, Vorimore F, Aaziz A, Solmonson L, Hsia C, Bavoil P et all. Chlamydia Buteonis, a New Chlamydia Species İsolated from a Red-Shouldered Hawk. Systematic and Applied Microbiology 2019, 42(5).
18. Taylor-Brown A, Bachmann NL, Borel N, Polkınghorne A. Culture-İndependent Genomic Characterisation of Candidatus Chlamydia Sanzinia, a Novel Uncultivated Bacterium İnfecting Snakes. BMC Genomics 2016, 17, 710.
19. Ataman B, Hakioğlu F. Eskişehir Bölgesinde Enzootik Koyun Virusi Abortusu Bakımından Araştırmalar. Türk Vet.Hek.Dern.Derg. 1955, 110-111.
20. Yılmaz S, Bandırma Merinos Çiftliği ile Tahirova Türk-Alman Örnek Çiftlikleri Koyunlarında Tespit Edilen Virusi Abort Vak'aları. Etlik Vet.Bak.Enst.Derg. 1962, 1,(6), 460-470.
21. Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Yardımcı H, ve ark. Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayın Serisi: No: 50, 1. Baskı, Ankara. 2002; 95-99
22. World Organisation for Animal Health (OIE) (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.7.4., Avian Chlamydiosis. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.
23. Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal ÖM, Paracıkoğlu J, Akan M. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Paracıkoğlu J. (Editör). Chlamydia ve Chlamydophila İnfeksiyonları, İlke-Emek Yayınları, Ankara. 2006; s. 305-312
24. Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and Host Cells in Vitro. Review of Microbiology 1991, 55, 143-190. 63
25. Litwin J. The Growth Cycle of the Psittacosis Group of Organisms. Journal of

Infectious Diseases 1959, 109, 129-160.
26. Kömeç S. Gebe Kadınlarda Klamidya Enfeksiyonu Seroprevalansı. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erzurum 2013
27. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Karaman, M., Akay, Ö, Diker, KS. Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı. Medisan, 1997Ankara.
28. Schachter J. Chlamydia. Gorbach SL, BJ, Blacklow NR. Philedelphia: WB Saunders Company 1998. 1980-90
29. Kuo, C.-C, Stephens RS, Bavoil PM, Kaltenboeck B. Genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns 1945, 55, in: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hed-lund, BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. (Eds.), Bergey'sManual of Systematic Bacteriology 4 second ed, Springer Heidelberg, (2011) p.846–865
30. Carter GR, Wise DJ. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology (6th ed), Michigan State University Press, East Lansing, Michigan, 2004, 290.
31. Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. Review of Microbiology 1991, 55.1: 143-190.
32. Samkange A. Seroprevalence survey of Chlamydophila abortus infection in breeding goats on commercial farms in northern Namibia. University of Pretoria. Doctoral thesis. December 2007.
33. Malal E. Marmara Bölgesinde Ruminant Abortlarında Chlamydia Abortus'un Real Time PCR ile Teşhisi ve Multilokus VNTR Analizi ile Genotiplendirilmesi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi, Aydın 2020
34. Essig A, Longbottom D. Chlamydia Abortus. New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. Current Clinical Microbiology Reports 2015, 2:22–34
35. Borel N. Chlamydial Abortion in Ruminants. Serological, Epidemiological and Diagnostic İnvestigations, Zurich, University of Zurich, Vetsuisse Faculty, 2008.
36. Rodolakis A, Mohamad KY. Zoonotic Potentialof Chlamydophila. Vet. Microbiol, 2010, 40, 382-391.
37. Rodolakis A. Caprine Chlamydiosis: in Recent Advances in Goats Diseases. Edited by Tempesta M. International Veterinary Information Service 2001.

38. Longbottom D, Coulter L. Animal Chlamydiosis and Zoonotic İmplications. Journal of Comparative Pathology 2003, 128, 217-244.
39. Stuen S, Longbottom D. Treatment and Control of Chlamydial and Rickittsial İnfections in Sheep and Goats. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 2011, 27, 213-233
40. Rekiki A, Bodier C, Berri M, Rodolakis A. Efficacy of Vaccines Against Chlamydiosis and Q Fever: Bringing-in The Murine Model. Small Ruminant Research 2006, 62, 117-119.
41. Borel N, Doherr MG, Vretou E, Psarrou E, Thoma R, Pospischil A. Seroprevalences for Ovine Enzootic Abortion in Switzerland. Preventive Veterinary Medicine 2004, 65, 205–216.
42. Simeonov K, Chilingirova M. Chlamydia Abortus and Coxiella Burnetii- Related Abortions in Small Ruminants in Bulgaria During a Five-Year Period (2013-2018). Acta Microbiologica Bulgarica 2018, 34 (4), 236-239.
43. Pereıra MF et al. Ocorrência e Fatores de Risco Para Chlamydophila Abortus Em Ovinos e Caprinos no Estado de Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira, V.29, N.1, P.33-40, 2009
44. Duman R, Durak Y. Konya Yöresindeki Koyunlarda Atıklara Neden Olan Chlamydia psittaci İnfeksiyonlarının Komplement Fikzasyon Testi ile Araştırılması. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 1998, 22, 511–515.
45. Türütoğlu H, Ergani GO. Studies on İsolation of Chlamydia Psittaci Caused to Abortion in Ewes. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 1996, 27, 55-78.
46. Güler L, Hadimli HH, Erganiş O, Ateş M, Ok Ü, Gündüz K. Field Evaluation of a PCR for the Diagnosis of Chlamydial Abortion in Sheep. Veterinary Record 2006, 159, 742-745.
47. Çaya, H, Aslantaş Ö, İyisan AS, Mirioğlu M, Tunca ŞT. Investigation of Antibodies Against Chlamydophila Abortus (Chlamydia Psittaci Serotype 1) Using Microcomplement Fixation Test (Mcft) and Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA). Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2006, 17
48. Gökçe HI, Kacar C, Genç O, Sözmen M. Seroprevalence of Chlamydophila abortus in Aborting Ewes and Dairy Cattle in The North-East Part of Turkey. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2007, 51, 9-13.

49. Küçükayan U, Dakman A, Ülker U, Müştak K. Koyun Kan Serumları ve Fetuslarının Bakteriyel Atık Etkenleri Yönünden İncelenmesi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2007, 18 (1-2), 11-16.
50. Öztürk D, Türütoğlu H, Kaya M. Burdur İlindeki Koyunlarda Chlamydophila Abortus Enfeksiyonunun Seroprevalansı. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2016, 1 (2), 17-20.
51. Kalender H, Kılıç A, Eröksüz H, Muz A, Kılınç Ü, Taşdemir B. Identification of Chlamydophila Abortus İnfection in Aborting Ewes and Goats in Eastern Turkey. Revue de Médecine Vétérinaire 2013, 164 (6), 295-301.
52. Karagül MS, Malal ME, Akar K. Investigation of Coxiella Burnetii and Chlamydia Abortus Antibodies in Sheep in Düzce region. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2019, 9(3), 106-109.
53. Kadra B, Balla É. Development and Production of Vaccines Against Abortion Caused by Chlamydophila Abortus and Coxiella Burnetti in Small Ruminants. Small Ruminant Research 2006, 62, 75-78.
54. Teankum K, Pospıschıl, A, Jannet F, Brugnera E, Hoelzle LE, Hoelzle K, Weılenmann R et all. Prevalence of Chlamydiae in Semen and Genital Tracts of Bulls, Rams and Bucks. Theriogenology, 2007 67: 303-310.
55. Manasrah MYI. Chlamydophila abortus vaccine study and disease surveillance on palestinian farms in the Bethlehem Region. Master of Science Thesis, Palestine Polytechnic University Deanship of Higher Studies and Scientific Research and Bethlehem University Faculty of Science, Palestine, 2013, 121.
56. Livingstone M, Wheelhouse N, Maley SW, Longbottom D. Molecular Detection of Chlamydophila Abortus in Post-Abortion Sheep at Oestrus and Subsequent Lambing. BMC Veterinary Microbiology 2009, 135(1-2):134-41.
57. Jones, GE; Anderson, IE. Chlamydia psittaci : Bademcik Dokusu, Koyunlarda Enzootik Düşükte Giriş Kapısı Mıdır? Veteriner Hekimlikte Araştırma , v.44, s.260-261, 1988
58. Navarro JA ve ark. Deneysel olarak enfekte Hamile koyunlarda enfeksiyon kinetiği ve Chlamydophila abortus'un plasentası üzerindeki etkileri . Veteriner Patoloji 2004, v.41, s.498-505.
59. Development and Evaluation of an İndirect ELISA to Detect Antibodies to Abortion

Strains of Chlamydia Psittaci in Sheep Sera Elsevıer Veteriner Mikrobiyoloji Cilt 43 Sayı 1,Ocak1995, s 1-12

60. Aitken ID. Diseases of Sheep (4th ed), Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK, 2007, p.105-112
61. Longbottom D, Livingstone M, Maley S, Zon A, Rocchi M, Wilson Ket al.. Intranasal infection with Chlamydia abortus induces dose-dependent latency and abortion in sheep. Plos One 2013, 8 (2), e57950.
62. Chanton-Greutmann H, Thoma R, Corboz L, Borel N, Pospischil A: Abortion in Small Ruminants in Switzerland: Investigations During Two Lambing Seasons (1996–1998) with Special Regard to Chlamydial Abortions. Schweiz Arch Tierheilk, 2002, 144, 483-492.
63. Wıttenbrınk MM ve Ark. İnfertilite Nedeni Olarak Büyükbaş Hayvan Genital Yolunun Chlamydia Psittaci ile Enfeksiyonu. Evcil Hayvanların Yeniden Üretimi, v.28, s. 129-136, 1993a.
64. Gomes MJP et all. Rio Grande Do Sul A Hora Veterinária, n. 119, s.43-46, 2001'de seminalvezikülitli Boğalarda Chlamydia Psittaci'nin İzolasyonu.
65. Manasrah MYI. Chlamydophila Abortus Vaccine Study and Disease Surveillance on Palestinian Farms in the Bethlehem Region. Master of Science Thesis, Palestine Polytechnic University Deanship of Higher Studies and Scientific Research and Bethlehem University Faculty of Science, Palestine, 2013, 121.
66. Walder G, Hotzel H, Brezinka C, Gritsch W, Tauber R, Würzner R, Ploner F. An Unusual Cause of Sepsis During Pregnancy. Obstetrics and Gynecology 2005, 106 (5), 1215–1217.
67. Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Gebbers FO. Abortion in Woman Caused by Caprine Chlamydophila Abortus (Chlamydia Psittaci Serovar 1). Swiss Medical Weekly 2002, 132.
68. WEB_2. (2018). Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü internet sitesi. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.05_ENZ_ABOR.pdf, 24.09.201964-66.
69. Ward M. The İmmunobiology and İmmunopathology of Chlamydial İnfections. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 2006, 103, 769–796. 68
70. OIE(Office international des epizooties), World Organization for Animal health,

Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapter 3.7.5, 2018
71. Gımenez DF. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. Stain Technol. 1964, 39, 135–140
72. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent Developments in The Laboratory Diagnosis of Chlamydial İnfections. Veterinary Microbiology 2009, 135, 2–21. 65
73. Sachse K, Grossman E. Chlamydial Diseases of Domestic Animals-Zoonotic Potential of The Agents And Diagnostic İssues. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift 2002; 109: 142-148.
74. Everett KDE, Andersen AA. Identification of Nine Species of The Chlamydiaceae Using PCR RFLP. International Journal of Systematic Bacteriology 1999, 49, 803-813.
75. Laroucau K, Vorimore F, Sachse K, Vretou E, Siarkou VI, Willems H, Magnino S, Rodolakis A. Bavoil PM. Differential İdentification of Chlamydophila Abortus Live Vaccine Strain 1B and C. Abortus Field İsolates by PCR-RFLP. Vaccine 2010, 28, 5653–5656.
76. Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. New Real-Time PCR Tests For Species-Specific Detection Of Chlamydophila Psittaci And Chlamydophila Abortus From Tissue Samples. The Veterinary Journal 2009, 181, 145, 150.
77. Borel N, Kempf E, Hotzel H, Schubert E, Torgerson P, Slickers P, Ehricht R, Tasara T, Pospischil A, Sachse K. Direct İdentification of Chlamydiae from Clinical Samples Using a DNA Microarray Assay – A Validation Study. Molecular and Cellular Probes 2008, 22, 55–64.
78. Aitken ID, Clarkson K, Linklater K. Enzootic Abortion of Ewes. Vet Rec. 1990 126, 136-138
79. Blood, DC. and Radostıts, OM. Diseases caused by viruses and Chlamydia II. Viral Diseases Characterized by Respiratorysigns. in Veterinary Medicine, Seventh edition Bailliere-Tindall, Oxford 1989, 878-910.
80. OIE. Enzootic Abortion of Ewes (Ovine Chlamydiosis) (Infection with Chlamydia Abortus). Chapter 2.7.6, 2018. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.06

81. Dawson M. Chlamydia, In: Laing JA, Brinley Morgan WJ, Wagner WC. Fertility and Infertility in Veterinary Practice, The University printing House, Oxford, 1988,280.
82. Jonker HF: Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. Anim Rep Sci 2004 82-83: 415-430
83. Otlu S, Sahin M, Unver A, Celebi O. Detection of Brucella Melitensis and Chlamydophila Abortus
84. OIE. Enzootic Abortion of Ewes (Ovine Chlamydiosis) (Infection with Chlamydia Abortus). Chapter 3.7.5 2018.
85. Bommana S, Jelocnik M, Borel N, Marsh I, Carver S, Polkinghorne A.Thelimitations of Commercial Serological Assays for Detection of Chlamydial İnfections in Australian Livestock. J Med Microbiol. 2019 Apr;68(4):627-632.
86. Wilson K, Livingstone M, Longbottom D, Comparative Evaluation of Eight Serological Assays for Diagnosing Chlamydophila Abortus İnfection in Sheep, Veterinary Microbiology (2008), doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.043
87. R Minic, Zivkovic I. Optimization, Validation and Standardization of ELISA. 10.5772/intechopen.94338 2020.