

45228

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİNDEKİ KOYUNLARDA
ATIKLARA NEDEN OLAN CHLAMYDIA
ENFEKSİYONLARININ SEROLOJİK
ARAŞTIRILMASI

Rüstem DUMAN
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Konya, 1996

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİNDEKİ KOYUNLARDA ATIKLARA
NEDEN OLAN CHLAMYDIA ENFEKSİYONLARININ
SEROLOJİK ARAŞTIRILMASI

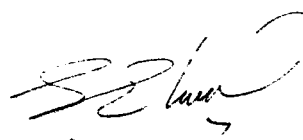
Rüstem DUMAN

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

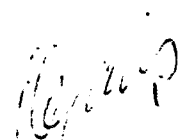
Bu tez 4.10.1996 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Yusuf DURAK
(Danışman)



Prof. Dr. Samir EKMEKÇİ
(Üye)



Doç. Dr. Osman ERGANİŞ
(Üye)

ÖZET

Doktora Tezi

KONYA BÖLGESİNDEKİ KOYUNLARDA ATIKLARA NEDEN OLAN CHLAMYDIA ENFEKSİYONLARININ SEROLOJİK ARAŞTIRILMASI

Rüstem DUMAN
Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yusuf DURAK
1996, sayfa: 51

Juri: Doç. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ
Doç. Dr. Osman ERGANİŞ

Bu çalışmada, Konya yöresinde 1993-1994 kuzulama sezonunda abort yapan koyunlardan alınan toplam 224 koyun kan serumu, Komplement Fiksasyon Testi (KFT) ile Klamidyoz yönünden araştırılmıştır.

KFT' nde Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan *Chlamydia psittaci* S 26/3 suşu ile enfekte edilen embriyolu tavuk yumurtalarının sarı keselerinden hazırlanan süspansiyon antijen olarak, kobay serumu komplement olarak ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda koyun eritrositleriyle immünize edilen tavşanlardan hazırlanan antiserumlar amboseptör (hemolitik serum) olarak kullanıldı.

224 örnekten 45 (%20)' i 1/16-1/32 antikor titreleri arasında pozitif, 28 (%12.5)' i 1/8 antikor titresinde şüpheli ve geriye kalan 151 (% 67.4)' i 1/8' den düşük antikor titrelerinde negatif bulundu.

ANAHTAR KELİMELER: *Chlamydia psittaci*, Klamidyoz, Komplement Fiksasyon Testi.

ABSTRACT

Doctorate Thesis

SEROLOGICAL INVESTIGATION OF CHLAMYDIA INFECTIONS WHICH CAUSED ABORTIONS IN SHEEP OF KONYA REGION

Rüstem DUMAN

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied
Sciences Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yusuf DURAK

1996, Page: 51

Jury: Assoc. Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ

Assoc. Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

In this study, a total of 224 sheep blood sera which have been taken from aborted ewes during the 1993-1994 lambing season in Konya region. have been investigated for Chlamydiosis by Complement Fixation Test (CFT).

In CFT, a suspension which have been prepared from the yolk sacs of embryonated hens' eggs infected with S 26/3 strain of *Chlamydia psittaci* which was provided from Pendik Veterinary Control and Research Institute as antigen, guinea pig serum as complement and rabbit antisera immunized by sheep erythrocyte which was prepared by Selçuk Universtiy Vet. Fac. Department of Microbiology as amboceptor (haemolytic serum) have been used.

45 samples (20 %) out of 224 were positive with the titration between 1/16-1/32, 28 samples (12.5 %) were suspected to 1/8 antibody titre and remained 151 samples (67.4 %) were negative to antibody titres of less. than 1/8.

KEY WORDS: *Chlamydia psittaci*, *Chlamydiosis*, Complement Fixation Test.

TEŞEKKÜR

İlgi duyduğum bu konuda bana çalışma fırsatı veren ve çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Yusuf DURAK (S. Ü. Fen-Edb. Fak.)' a, araştırmamda faydalı uyarıları ile yol gösteren sayın Doç. Dr. Osman ERGANİŞ ve Doç. Dr. Sibel YAVRU (S. Ü. Vet. Fak.)' ya, araştırmamda kullandığım antijen ve literatürleri temin eden sayın Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU (Pendik Vet. Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Aerob Ünitesi)' na teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Hastalığın Coğrafi Yayılışı	3
2.2. Klamidyalarn Özellikleri	4
2.3. Epizootoloji	7
2.4. Klinik Semptomlar, Patoloji ve Patogenez	8
2.5. Teşhis	10
2.5.1. Direk teşhis	10
2.5.2. İndirek teşhis	12
2.6. İmmünite	14
2.7. Kontrol	15
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Antijen	18
3.2. Serolojik Araştırmada Kullanılan Serumlar	18
3.3. Hemolitik Serum (Amboseptör)	19
3.4. Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları	19
3.5. Komplement	19
3.6. Koyun Eritrosit Süspansiyonu	20
3.7. Araştırmada Kullanılan Solüsyonlar	20
3.7.1. Phosphate buffered saline (PBS) solüsyonu	20
3.7.2. Alsever solüsyonu	21
3.8. Komplement Fiksasyon Testi	21
3.8.1. Eritrosit süspansiyonunun hazırlanması	21
3.8.2. Hemolitik serum (amboseptör)' un hazırlanması	22
3.8.2.1. Hemolitik serum (amboseptör)' un titrasyonu	22
3.8.3. Komplementin hazırlanması	24
3.8.3.1. Komplementin titrasyonu	24
3.8.4. Antijenin titrasyonu	26
3.8.5. Komplement fiksasyon testinin yapılışı	27
4. DENEY SONUÇLARI	30
4.1. Hemolitik Serum Titre Sonucu	30

4.2. Komplement Titre Sonucu.....	30
4.3. Antijen Titre Sonucu	30
4.4. Komplement Fiksasyon Test Sonuçları.....	31
5. TARTIŞMA	33
6. KAYNAKLAR.....	38



SİMGELELER

°C :	celsius derecesi
dk :	dakika : 60 saniye
µl :	mikrolitre : 10 ⁻⁶ litre
ml :	mililitre : 10 ⁻³ litre
µm:	mikrometre : 10 ⁻⁶ metre

Kısaltmalar

A.K. :	Antijen Kontrol
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
H.S.K. :	Hemolitik Sistem Kontrol
KFT :	Komplement Fiksasyon Testi
K.K. :	Komplement Kontrol
MHD :	Minimal Hemolitik Doz
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PBS K. :	PBS Kontrol
P.S.K. :	Pozitif Serum Kontrol
N.S.K. :	Negatif Serum Kontrol

1. GİRİŞ

Yaklaşık 43.5 milyon koyun ve 15 milyon keçi popülasyonu ile sayısal olarak dünyada ilk altı ülke arasında yer alan ülkemizde, koyun ve keçi yetiştiriciliğinin ülke ekonomisinde çok önemli bir yeri vardır. Yıllık et üretiminin %32' si, süt üretiminin %22' si koyundan sağlanmaktadır. Önemli deri mamüllerinin, halı, kilim ve benzeri yünlü ve kıl dokumalarının ham maddeleri de koyun ve keçilerden sağlanmaktadır. Türkiye' nin mevcut hayvancılık sektörü içinde, dış pazarlarda rekabet gücüne sahip hayvancılık dalları içerisinde koyuncululuğun, tavukçuluktan sonra gelen en önemli hayvancılık dalı olduğu ekonomi uzmanlarınca açıklanmış bulunmaktadır (1).

Bu sektörde üretimden tüketime her kademede büyük sorunlar olagelmıştır. Bunlar arasında da, yetiştiricilik ve hastalık sorunları daima güncelliğini korumuştur. Koyun yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen faktörlerin başında ise, değişik sebeplerden oluşan yavru atmalar (abortuslar) gelmektedir. Yavru atmalara neden olan başlıca sebepler; başta tüm abort olayları içerisindeki yeri %50' den fazla olan enfeksiyöz etkenler olmak üzere, nonenfeksiyöz nedenler (ilaç, kimyasal madde ve bitki zehirlenmeleri), hormonal sebepler (östrojenler, progesteron yetersizliği, cortisol fazlalığı, prostaglandinler ve stresler), beslenme bozuklukları (bakır, kobalt, selenyum, iyot, manganez ve A vitamini eksikliği, zayıflık ve aşırı parazit invazyonları) ve karışık sebepler (kromozomal veya genetik letal faktörler, şiddetli fiziksel stres, ikizlik veya daha fazla sayıda yavru) olarak sıralanabilirler (1, 2).

Koyunlarda abortuslara neden olan enfeksiyöz atık etkenlerinin tespit edilmesi, hastalıktan korunma ve mücadele programlarının hazırlanması için gereklidir. Yavru atma olaylarındaki çalışmalar daha çok Bruselloz, Kampilobakterioz, Salmonelloz ve Listerioz gibi bakteriyel hastalıklar ile Border Disease, Akabane Disease, Foot and Mouth Disease (Şap hastalığı) ve Bluetongue Disease (Mavi Dil Hastalığı) gibi viral hastalıklar üzerinde yoğunlaşmakta, Klamidyoz üzerinde fazla durulmamaktadır. Chlamydia cinsinin *Chlamydia psittaci* türü, bütün evcil ve yabani memelilerde olduğu gibi koyunlarda da enzootik abortusun asıl nedenlerinden birisidir ve önemli ekonomik kayıplara yol açarlar. Büyük ekonomik kayıplara yol açmalarının yanında, insanlarda, özellikle gebe kadınlarda enfeksiyonlara neden olmaları konunun zoonotik önemini daha da artırmaktadır (3, 4, 5).

Klamidyalardan sebep olduğu farklı hastalıklar ile birlikte eşlik eden klinik belirtiler, doğru bir teşhis için yeteri kadar spesifik değildirler. Enfekte edilen

dokularda etkenin direk gözle görülebilir hale getirilmesi, nispeten hızlı, ancak kullanışlılığı muayene için çoğunlukla uygun olmayan plasental dokuların dökülme gösteren sitolojik preparatları ile sınırlı kaldığı için, teşhise dayalı duyarlı bir yöntem olarak gözükmektedir. Klinikle ilgili numunelerden klamidyaların izolasyonu, çoğunlukla kullanılan tavuk embriyo teknikleri yerine geçen daha hızlı ve duyarlı hücre kültürü metodları ile ıslah edilmiş olmakla birlikte, metodun uygulanması oldukça güç ve zaman alıcı olmaktadır (6).

Bazı araştırmacılar (7, 8), Klamidyoz' un teşhisinde kullanılan serolojik yöntemlerle, aşı uygulanan sürülerin, enfeksiyonu geçiren aşısız sürülerden ayırt edilemeyeceğini bildirmekte iseler de; ülkemizde *C. psittaci* için aşı uygulanmadığından antikorların varlığı, klamidyal enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilebilir. Bütün bu sebeplerden dolayı, sığır, koyun ve keçilerin klamidyal enfeksiyonlarının teşhisi, başlıca serolojik yöntemlere dayandırılır. Bunlardan cinse özel bir klamidyal antijen ve kobay komplementi kullanılan Komplement Fiksasyon Testi (KFT), çok yaygın olarak kullanılan bir testtir. Klamidyal serolojide kullanılmak üzere birçok alternatif testler teklif edilmiş olmakla birlikte, bu testler KFT kadar yeterli düzeyde standardize edilmiş değildirler (6).

Bu çalışma ile, Konya bölgesinde abort yapan koyunlardan toplanan kan serumlarında KFT uygulanmak suretiyle, klamidy enfeksiyonlarına karşı gelişen antikor varlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hastalığın Coğrafi Yayılışı

Klamidyoz; kuşlar, memeliler ve basit yapılı diğer omurgalıların doğal olarak geçirmeleri mümkün olan bir hastalıktır (9). Koyunlarda abortus, ölü doğum veya prematüre doğumlara neden olan Klamidyoz' a; başta Avrupa ve Balkan ülkeleri olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde ve bu arada ülkemizde de rastlanmaktadır (1).

İskoçya' da her sene bir sürüdeki gebe koyunların %5-10' unda atıklara neden olan ve hiçbir bakteriyel etkenin izole edilemediği bir hastalıktan ilk kez 1936 yılında Greig tarafından söz edildiği bildirilmektedir (10, 11, 12). Stamp ve ark. (11), 1950 yılında, koyunların enzootik abortusu olarak adlandırdıkları bu hastalığın, *Rickettsia* veya *Psittacosis-lymphogranuloma* grubu benzeri elementer cisimciklerin, fetal membranlarda çoğalması ile karakterize olduklarını açıklamışlardır. Takip eden yıllarda koyunların enzootik abortusu olarak adlandırılan bu hastalığın Fransa (3,13), Almanya (14, 15), Bulgaristan (12, 16), Macaristan (12, 13), Romanya (17), İtalya (12, 18) ve Amerika (3, 12, 13) gibi ülkelerde de tespit edildiği bildirilmiştir.

Biolatti ve ark. (19), 1991' de İngiltere' de abort yapan koyunların fetal membranlarından izole ettikleri *C. psittaci* ile deneysel olarak fareleri oral yolla enfekte etmişler ve farelerin akciğer, jejunum, dalak gibi organlarından hazırladıkları preparatları; immünofloresan, transmisyon elektron mikroskopi ve doku kültürlerinde incelemeye tabi tutarak koyunlarda abort etkeninin *C. psittaci* olduğunu belirtmişlerdir. İngiltere'de hayvanların en önemli klamidyal hastalığının koyunların enzootik abortusu olduğunu ve hastalıktan etkilenen sürülerde abort insidensinin oldukça yüksek (%30) bulunduğunu gösteren bir araştırmanın 1979 yılında Linklater ve Dyson tarafından yapıldığı bildirilmiştir (20). Yine İngiltere' de Wilsmore ve ark. (21), koyun sürülerinde görülen abort olayları üzerine, abort yapan koyunların fetal membranlarından aldıkları sıvaplardan inokulum hazırlayarak McCoy hücre kültürlerine ekim yapmış ve hastalık etkenini izole etmişlerdir. Thiele ve ark. (22), Almanya' da yaptıkları bir çalışmada, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile koyunların enzootik abort etkeni *C. psittaci*' yi tanımlamışlardır.

Türkiye' de ilk olarak Ataman ve Hakiöglu (23), 1955 yılında Eskişehir' in Beylikahır ve civar köylerinde abort yapan koyunlarda klamidyal organizmaları tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yılmaz (13), Bandırma Merinos Çiftliği ile Tahirova Türk-Alman Çiftlikleri koyunlarında enfeksiyöz karakterde çıkan abortus olaylarında serolojik olarak KFT ile klamidyalardan kaynaklanan abort olaylarının varlığını göstermiştir. Yine Yılmaz (24), Ceyhan Çukurova Harası' nda yavru atan koyunların plasenta kotiledonlarından etkenin izole edildiğini bildirmiştir. Kenar ve ark. (25), 1990 yılında Konya bölgesinde koyunlarda atklara neden olan *Brucella*, *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Chlamydia*' ların prevalansını ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmalarında 1063 koyun kan serumunda KFT ile Klamidyoz yönünden %17.3' lük bir oranda pozitiflik bulunduğunu ve bunun enfeksiyöz abortuslar içerisinde birinci sırada yer aldığını bildirmişlerdir.

2.2. Klamidyaların Özellikleri

Klamidyalar, önceleri *Psittacosis Lymphogranuloma Venereum (PLV)* veya *Trachoma Inclusion Conjunctivitis (TRIC)* etkenleri olarak bilinirlerdi. Bu mikroorganizmalar için, üzerinde ilk çalışanlardan biri olan Sir Samuel Bedson' un adına hürmeten *Bedsonia* ve ayrıca *Miyagawanella* gibi isimler de kullanılmıştır (3). Bugün, klamidyaya cinsine ait mikroorganizmalar "Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology" nin son baskısında *Rickettsia*' lar bölümü içindeki *Chlamydiales* takımının *Chlamydiaceae* familyasında yer almaktadırlar (26).

Klamidyalar, mukoz membranları oluşturan epitelyal hücrelere initial tropizm gösteren zorunlu hücre içi bakteriyel parazitleridirler. Klamidyalar, tam hücre içi parazitliklerinden dolayı uzun yıllar virüs olarak kabul edilmişlerdir. Bununla birlikte klamidyalar, DNA ve RNA' nın her ikisini de içermeleri, ikiye bölünerek çoğalmaları, hücre çeperine, ribozomlara ve metabolizmada görev alan aktif enzimlere sahip olmaları, bazı antibiyotikler (penisilin, sikloserin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin vs.) tarafından üremelerinin önlenmesi gibi özellikleri nedeniyle virüslerden ayrılırlar (3, 26, 27, 28).

Klamidyalar, küçük, kokoid, Gram-negatif, hareketsiz, sporsuz ve 0.2-1.5 µm çapında mikroorganizmalardır. Zorunlu hücre içi paraziti olduklarından sadece canlı hücrelerde ürerler. En yaygın kullanılan konakçı sistemleri, hücre kültürü, embriyolu tavuk yumurtası ve farelerdir (3, 10, 26, 27, 29, 30).

Klamidyaların morfolojik şekilleri ve aktiviteleri, üreme devresindeki basamaklara göre değişmektedir. Elektron mikroskopik çalışmalarla, elementer ve retikulat cisimcik olmak üzere iki farklı hücre tipine sahip oldukları ortaya konmuştur. Elementer cisimcik, yaklaşık 0.2-0.4 µm çapında, küçük ve küre şeklindedir. Klamidyaların enfeksiyöz formunu oluşturan elementer cisimcik, organizmanın hedef konakçı hücreye bağlanmasından ve içeriye girmesinden sorumludur. Elementer cisimcik, ekstrasellüler olarak yerleşir. Klamidyaların metabolik olarak aktif formu olan retikulat cisimcik ise, intrasellüler olarak yerleşir. İkiye bölünerek çoğalan retikulat cisimcik, yaklaşık 0.6-1.5 µm çapındadır. Mikroorganizma hücrede ürediği zaman, küçük ve büyük formlardan meydana gelen karakteristik mikrokoloniler "inklüzyon" olarak isimlendirilmektedir (3, 26, 27, 28).

Chlamydia cinsinde, meydana getirdikleri hastalıklara, sulfonamid duyarlılığına, antijenik kompozisyona, intrasellüler inklüzyonlara ve inklüzyonlarda glikojenin varlığına göre ayrılan *C. psittaci* ve *C. trachomatis* olmak üzere iki tür bulunmaktadır (3, 26, 28). *C. trachomatis*' in *trachoma*, *lymphogranuloma venereum* ve *mouse* olmak üzere üç biyotipi vardır. *Trachoma* ve *lymphogranuloma venereum* biyotipi insanlarda, *mouse* biyotipi ise farelerde enfeksiyonlara neden olur (28, 31).

İnsan, kanatlı ve memeli hayvanlarda zoonotik enfeksiyonlara neden olan diğer tür ise, *C. psittaci*' dir (20). *C. psittaci*, koyun ve sığırlarda "enzootik abortus", "poliartritis", sığırlarda "ensefalomiyelitis" ve kanatlılarda "psittacosis" gibi enfeksiyonların etkenidir (3, 32).

Son yıllarda insanların solunum sisteminden izole edilen, ancak hayvanlarda tespit edilemeyen Taiwan Acute Respiratory (TWAR) suşunun, *C. psittaci* ve *C. trachomatis* dışında yeni bir klamidyal etken olduğu bildirilmiştir (32). Ayrıca Fukushi ve Hirai (33), sporadik ensefalitis, enfeksiyöz poliartritis, pnömoni veya diyare gibi semptomlara sahip sığır ve koyunlardan izole etmiş oldukları klamidya suşlarını genetik analizlere tabi tutarak elde ettikleri sonuçlara göre, *C. pecorum*' u klamidya cinsinin dördüncü türü olarak teklif etmişlerdir.

Klamidyalarda başlıca iki antijenik komponentin varlığı tespit edilmiş ve bunların da hücre duvarında lokalize oldukları bildirilmiştir. Bunlardan biri, gruba özel (grup spesifik) antijen olup, bütün klamidya tarafından paylaşılır. Komplementi fikse edebilen bu ortak antijenik komponent; ısıya (100°C' de 30 dk), nükleaz ve proteinaz aktivitesine dayanıklı olup, lipopolisakkarit (LPS)

karakterindedir (2, 3, 7, 26, 27, 28). LPS yapısındaki bu cins spesifik antijen, diğer Gram-negatif bakterilerin LPS antijenlerine benzerlik gösterir, ancak tamamen aynı değildir (7, 28).

İkinci antijenik komponent ise, türe özel (tür spesifik) antijen olup, florokarbon veya deoksikolat ile cins spesifik antijenleri giderildikten sonra hücre duvarında ortaya çıkarılabilirler (2, 34). Isıya duyarlı (56°C ' de 30 dk) olan bu antijenler, enfeksiyöz elementer cisimcikler ile ilişkili olup, protein yapısındadırlar (3,34). Bu antijenler en iyi monoklonal antikörlerin kullanıldığı immünofloresan tekniği ile teşhis edilebilirler (35). *C. trachomatis* ve *C. psittaci*' nin en az 15-18 farklı tür spesifik antijeni vardır (26).

Klamidyalarda cins ve tür spesifik antijenlerden başka bir de yalnızca bir tür içindeki bazı klamidyal izolatlarda bulunan, *serotip spesifik antijenler* olarak da adlandırılan alt tür spesifik antijenlerin bulunduğu bildirilmiştir (36). İmmünofloresan testinde tip spesifik antijenlerine göre *C. trachomatis*' in *trachoma* biyotipinin serotipleri A, B, Ba, C-K, *lymphogranuloma venereum* (LGV) biyotipinin serotipleri ise L₁, L₂,L₃ olarak tanımlanmıştır (3, 26, 27). *C. psittaci* ile *C. trachomatis*' in *mouse* biyotipi henüz sistematik olarak serotiplendirilmemiştir (26). İnsanlardaki zoonotik enfeksiyonlardan da sorumlu kanatlı ve memeli hayvan orijinli birçok izolat *C. psittaci* olarak tek bir tür içinde toplanmıştır (26).

Klamidyalarda bazı tavuk ve fare eritrositlerini hemaglutine eden, fakat stabil olmayan hemaglutininleri bulunmaktadır (3, 26). Klamidyalarda elementer cisimciklerle ilişkili olan bir de toksik etkileri vardır ki, bu toksik etkilerine göre klamidyalarda nötralizasyon deneyleri ile gruplandırmak mümkündür (3, 37).

Klamidyalarda metabolik olarak aktif formu retikulat cisimcik, 660×10^6 molekül ağırlığında halkasal bir DNA molekülüne sahiptir ve bu DNA molekülü yaklaşık 600 farklı protein oluşturabilir (28).

Klamidyalarda ısıya dayanıksızdırlar. Enfektivitelerini 37°C ' de 48 saatte, 56°C ' de 5 dakikada kaybederler. -70°C ' de enfektivitelerini kaybetmezler (3, 7, 34). Eter, formalin ve fenol gibi antiseptiklere duyarlıdırlar. Başta tetrasiklinler olmak üzere kloramfenikol, eritromisin gibi kemoterapötiklere de duyarlıdırlar (37, 38).

2.3. Epizootoloji

C. psittaci den ileri gelen koyunların enzootik abortusu, plasentitis ve abortusla karakterize bulaşıcı ve enfeksiyöz bir hastalıktır (3). Enzootik koyun abortusunda *C. psittaci* nin çoğalma için tercih ettiği yer plasentadır ve gelişen plasental enfeksiyona bağlı olarak yavru atan koyunlar bulaşmanın temel kaynağıdır (7, 11). Yavru atan koyunlara ait plasenta ve uterus akıntılarında abort veya kuzulamadan birkaç gün önce ve sonrasında çok sayıda etkenin bulunduğu açıklanmıştır (7, 11). Enfeksiyonun tabiatında herşeyden önce abort yapan hayvanların embriyo zarları ve buna benzer enfeksiyöz materyallerle, örneğin; embriyo sıvıları, atık yapan koyunların vajen akıntılarıyla kirlenmiş yem, su, yataklık ot ve samanların peros olarak alınmasıyla meydana geldiği bildirilmektedir (2, 3, 7).

Stamp ve ark. (11), hastalığın gebe olmayan veya çiftleşmemiş koyunların temiz bir sürüye katılması ile de ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Parker ve ark. (39), saha koşullarında abort yapan koyunlarla temas eden koyunlarda enfeksiyonun görüldüğünü, ancak enfeksiyonu gizli olarak taşıyan koyunların da olabileceğini bildirmişlerdir. Etkeni alan koyunlarda mevcut gebeliğin sonlanmadığı, enfeksiyonun genellikle gelecek gebeliklerine kadar belirsiz kaldığı ve daha sonraki gebelikte abort olaylarının ortaya çıktığı tespit edilmiştir (7, 11, 39). Ancak Parker ve ark. (39), etkene maruz kalan koyunlarda aynı dönemde de enfeksiyonun tespit edildiğini bildirerek, bu durumu koyunlarda bağışıklığın farklı olmasına bağlamışlardır.

Jones ve Anderson (40), etkenin normal hava koşullarında birkaç gün, soğukta ise daha uzun süre canlılığını sürdürdüğünü belirterek aerosol bulaşmanın da olabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (7, 8, 41) ise, deneysel olarak enfekte edilen koçlarda etkenin sperma ile en az üç hafta süreyle çıkarıldığını bildirerek, enfekte koçlar vasıtasıyla da bulaşmanın olabileceğini bildirmişlerdir.

C. psittaci den ileri gelen abortuslar zoonotik enfeksiyonlara neden olmaktadır (3, 4, 5, 32, 42). Özellikle kuzulama döneminde yavru atan koyun ve keçilerle temasta bulunan gebe kadınlarda abort olaylarının görüldüğü bildirilmiştir (4, 5).

2.4. Klinik Semptomlar, Patoloji ve Patogenez

Klamidyaların sebep olduğu farklı hastalıklar ile birlikte eşlik eden klinik belirtiler, hastalığın doğru olarak teşhis edilmesinde yeterli derecede spesifik değildirler (6). Klamidyalar çoğunlukla asemptomatik enfeksiyon oluştururlar (43).

C. psittaci'nin neden olduğu koyunların enzootik abortusunda abort ve prematüre kuzulamalar hastalığın tanıtıcı bir özelliği ise de; enfekte koyunların normal sağlıklı kuzular doğurabildikleri bilinmektedir (7, 8, 44), bu nedenle klinik belirtiler, sürülerde enfeksiyonun insidensini belirlemede yetersiz kalmaktadır.

Enfekte koyunlar yavru atıncaya kadar semptomsuz kalırlar (3, 7). Hastalıkta en fazla ikinci kuzusunu taşıyan koyunlar etkilenir (11). Abort öncesinde ve sonrasında koyunların vaginalarından koyu kıvamda ve kırmızı-kahverenkli bir akıntının geldiği bildirilmiştir (45, 46). McEwen ve ark. (47), enfekte koyunlardan doğan kuzuların birkaç saat ile dört güne kadar öldüklerini açıklamışlardır.

Abort yapan veya prematüre kuzu meydana getiren koyunlarda sistemik bir bozukluğun olmadığı, daha sonra gebe kalarak normal doğum yaptıkları bildirilmiştir (7, 11). Ancak sürüde hastalıktan etkilenmemiş koyunlar ile canlı kalan kuzularda poliartritis ve konjunktivitis olaylarının tespit edildiği belirtilmiştir (48). Fötal membranların alıkondduğu (7, 11) veya ölü fetüslerin uterusunda birkaç hafta kaldığı (11) olaylar da bildirilmiştir. Stamp ve ark. (11), abort ve prematüre kuzulamalarla birlikte başlıca göze çarpan klinik semptomların genellikle gebeliğin sonuna doğru, daha çok normal gebelik süresinden iki veya üç hafta kadar önce meydana geldiğini, fakat bazı abort olaylarının normal doğum süresinden altı hafta kadar önce bile olabileceğini belirtmişlerdir.

Koyunlarda deneysel olarak oluşturulan klamidyal abort olaylarında klinik olarak gözlemler üzerine birçok araştırma (11, 46, 49, 50, 51) yapılmıştır. Bu araştırmalardan birinde Khanna ve ark. (50), koyunların deneysel enfeksiyonundan sonraki yedi gün içinde göz yaşı akıntısı ve anoreksiden başka iki fazlı bir termal cevap elde ettiklerini, enfeksiyonun 24 saati içinde vücut ısısının 39°C' den 40.2°C' ye yükseldiğini ve bu durumun klamidyal enfeksiyonun karakteristik bir özelliği olduğunu belirtmişlerdir. Fuensalida ve Rodolakis (49) te, gebelik süresinin yetmişinci gününde oluşturulan deneysel klamidyal enfeksiyonu izleyen iki fazlı bir ateşle birlikte birkaç olayda anoreksi, laksimasyon ve mukoz nasal akıntı gibi diğer klinik belirtileri de gözlemlediklerini açıklamışlardır.

Dişi koyunlar gebeliklerinin erken döneminde enfeksiyona duyarlı olup, plasenta ve fetüs enfeksiyonları gebelik süresinin yaklaşık altmışıncı gününde meydana geldiği halde; patolojik değişiklikler, gebelik süresinin doksan gün sonrasına kadar tespit edilememektedir (7). Bazı araştırmacılar (7, 52), bu patolojik değişiklikleri; kotiledonlarda nekroz ve renk değişimi, interkotiledonar dokuda kalınlaşma veya ödem ile birlikte hücre parçalarını kapsayan kirli pembe renkte bir eksudatın varlığı ile açıklamışlardır. Kotiledonlarda rastlanılan nekrotik odaklardan yapılan yüzeysel frotilerin mikroskopik muayenesinde intrasellüler eozinofilik inklüzyon cisimciklerine rastlanılabileceği bildirilmiştir (1).

Enfeksiyonla ilgili olarak abort, prematüre veya vaktinde doğan zayıf kuzuların fötal membranlarında gözlenen makroskopik bulguların sayısı farklıdır (7). Aitken (7)' in bildirdiğine göre, koyunların enzootik abortusunda en önemli lezyon vasküler plasentomda meydana gelmektedir. Plasentomal enfeksiyonda makrofaj, nötrofil ve lenfositlerin lokal infiltrasyonu gözlenmiştir (7, 11, 52). Yine Aitken (7)' in bildirdiğine göre, plasentanın bütün plasentomları etkilenmemekte, yangısal ve destrüktif bozuklukların seviye ve yaygınlığı da farklı olmaktadır. Ancak plasentomların önemli bir kısmında oluşan fonksiyon bozukluğu nedeniyle anne ve fetüs ilişkisi bozularak fötal ölümler meydana gelmektedir.

Miller ve ark. (45), fetüste spesifik bir makroskopik bulgunun gözlenmediğini bildirmişlerdir. Ancak karaciğer ve lenfatik organlar ile daha az oranda akciğer, dalak, deri ve beyinde bazı patolojik değişiklikler gözlenmiştir (7).

2.5. Teşhis

2.5.1. Direk teşhis

Klamidya enfeksiyonlarının direk teşhisi, etkenin izolasyon ve identifikasyonu ile yapılır. Canlı hücrelerde üreyen klamidyalarn izolasyonunda en yaygın kullanılan konakçı sistemlerinin embriyolu tavuk yumurtası, hücre kültürü ve fareler olduğu bildirilmiştir (3, 26, 34, 53).

Klamidyal etkenlerin izolasyonu için materyal olarak atık yapan hayvanlardan nekrotik ve ödematöz olan plasenta, kotiledon, korionik membran, amniotik sıvılar ve vaginal sıvıplar, atıklardan ise akciğer, dalak, karaciğer ve mide içeriği alınabilir. Canlı hayvanlardan gaita, rektal ve konjunktival sıvıplar da uygun materyallerdir (54, 55, 56, 57). Kanatlı hayvanlardan kloakal, trakeal sıvıplar ve taze gaita, ölülerden ise barsak, akciğer, dalak, karaciğer, trakea, perikardium ile birlikte kalbin apeksi alınabilir (58).

Enzootik koyun abortusunun teşhisi, plasentanın makroskopik muayenesi ve plasental kotiledonlardan hazırlanan boyalı preparatlarda klamidyal elementer cisimciklerin görülmesi ile yapılabilmektedir (11, 12, 54, 59). Hastalıklı maddeden hazırlanan sürme preparatlar modifiye Ziehl-Neelsen (Stamp), Giemsa, Macchiavello, Castaneda veya Gimenez boyama yöntemleri ile boyanarak, etkenler mikroskop altında tek tek veya hücreler içinde küçük kümeler halinde kokoid cisimcikler olarak gösterilebilmektedirler (3, 60). Ancak Aitken (7, 61), morfoloji ve boyanma özellikleri bakımından Q fever'in etkeni *Coxiella burnetii* ile *C. psittaci* arasında benzerlik olduğunu, şayet hastalıklı maddenin alındığı sürünün geçmişi bilinmiyor ve klamidyal plasenta patolojisine ait bir bulgu da yoksa, ayırımın zor olduğunu, pratik ayırımın ancak serolojik yöntemlerle yapılabileceğini bildirmiştir.

Johnson ve ark. (54), plasentanın her zaman temin edilemediği gibi, ağır enfekte plasentalarda elementer cisimcikleri teşhis etmenin oldukça güç olduğunu bildirmişlerdir. Plasentanın temin edilemediği durumlarda, vaginal sıvıplar (7, 40, 61) ile yeni atık veya ölü doğmuş kuzuların ıslak yünlerinden (7, 61, 62) hazırlanan sürme preparatlarda elementer cisimcikler aranabilir. Ancak fetal membran dışındaki

bu materyallerde etkenin daha az bulunması nedeniyle, mikroskopik olarak etken belirlenemeyebilir (11, 61). Fetüsün mide içeriğinde ise etkene rastlanamayacağı belirtilmiştir (7).

Koyunların enzootik abortus etkeni olan *C. psittaci*'nin izolasyonu, daha çok bakteriyel, mikoplazmal ve viral enfeksiyonlar yönünden steril olan embriyolu tavuk yumurtasında yapılmaktadır (11, 12, 58,61, 63). *C. psittaci*, 6-8 günlük embriyolu tavuk yumurtasının sarı kese membranında üremektedir (3, 26, 60,61). Embriyolu tavuk yumurtası tekniğinde izolasyonun yaklaşık üç hafta sürmesi ve hücre kültürü gibi ikinci bir işlemi gerektirmesi dezavantaj olarak kabul edilmektedir (3).

Klamidyalarn izolasyonunda hücre kültürleri de yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu amaçla McCoy (10, 29, 54), Baby Hamster Kidney-21 (10, 41), HeLa (64, 65), Vero (66), koyun fibroblastı (30) gibi hücre kültürleri kullanılmaktadır. Hücre kültürlerinin, etkenin floresan antikor veya diğer boyama teknikleri ile kolayca boyanarak gösterilmesi gibi avantajları vardır (58), ancak bakteriyel kontaminasyon ve kontaminasyonun yayılması gibi durumlar etkenin hücre kültürlerinde izole edilme şansını azaltmaktadır (54).

Klamidyalarn farelerde izolasyonu, fare bulunduran, fakat embriyolu tavuk yumurtası ve hücre kültürü hazırlama imkanına sahip olmayan laboratuvarlar için elverişlidir. Bu invivo test sistemindeki temel güçlükler, sonucun 18-20 günde alınması ve farelerin sürekli bakım gerektirmesidir (58).

Hastalıklı madde içinde *C. psittaci*'nin varlığı, spesifik antiserum veya monoklonal antikorların kullanıldığı floresan antikor tekniği ile de gösterilmektedir (58, 61, 67).

Son zamanlarda uygulanmakta olan, oldukça basit ve kısa zamanda sonuç veren "Clearview" testi ile denatüre olmuş materyallerde bile antijen tespit edilebilmektedir. Bu testin sensitivitesi %96.3, spesifitesi ise %94.1 olarak belirlenmiştir (68).

Souriau ve Rodolakis (69), abort yapan koyun ve keçilerin vaginal sıvıplarında *C. psittaci*'nin teşhisinde, Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testinin diğer testlerden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

2.5.2. İndirek Teşhis

Klamidya enfeksiyonlarının indirek teşhisinde çeşitli serolojik testler kullanılmasına karşın, en yaygın olarak Komplement Fiksasyon Testi (KFT) kullanılmaktadır (7, 49, 60, 61, 67). Bu serolojik metod, enfeksiyonun sistemik bir fazı ile birlikte klamidyalardan sebep olduğu hastalıkların teşhisinde faydalıdır, fakat zayıf humoral antikor cevabına yol açan lokal enfeksiyonlarda yetersiz kalmaktadır (6). Enfekte koyunlar, atıktan 10 gün önceki ve sonraki devrede etrafa en fazla abortus etkeni saçmaktadırlar. Bu süre içerisinde aynı hayvanların kan serumları KFT'nde genellikle olumsuz reaksiyon vermektedir. Hastalığın KFT ile teşhisinde, abort sırasında ve aborttan 2-3 hafta sonra veya sürüde abort yapan ve yapmayan koyunlardan olmak üzere kan serum örneklerinin alınması ile daha sağlıklı sonuç elde edileceği bildirilmiştir (7, 61,70). Aşılı veya diğer klamidyal enfeksiyonlara sahip olan koyunlarda komplementi fikse eden antikor seviyeleri genellikle düşük, abort yapan koyunlarda ise bu antikor titreleri oldukça yüksektir (7, 8).

Stamp ve ark. (71), koyunlarda abortlara neden olan *C. psittaci* enfeksiyonunun indirek teşhisinde KFT'ni kullanmışlar ve abort yapan 146 koyun üzerinde yaptıkları seroepidemiolojik çalışmada, koyunların %81.8'inin hastalık etkenine karşı komplementi fikse eden antikor içerdiklerini göstermişlerdir. Çalışmada 1/16 ve daha yukarı titreleri pozitif kabul etmişlerdir. Mitscherlich (70), herhangi bir abort olayı görülmeyen klinik olarak sağlıklı 13 değişik koyun sürüsüne ait 240 kan serumu ile abort olayları görülen bir sürüdeki ana koyunlardan aldığı 32 adet kan serumunda KFT ile yaptığı çalışma sonucu; abort olaylarının görüldüğü koyunlardan alınan 32 adet kan serumunun 18'inde (%56.2) 1/8 ve yukarısında abort etkeni *C. psittaci'*ye karşı oluşan antikor titresi tespit ettiği halde, abort olaylarının görülmediği sürülerden alınan 240 kan serumunun hiçbirinde 1/8 ve yukarısında antikor titresi tespit edememiş ve pozitiflik sınırı olarak 1/8 ve üzerinde antikor titrelerini almıştır. Yılmaz (13), patojen bir abort etkenin izole edilemediği koyunlardan üç hafta sonra alınan 311 kan serumunu KFT ile inceleyerek, 1/4 sulandırılarda negatif lizis veren 19 serumu (%6.1) şüpheli, 1/8 ve daha yukarı sulandırmalarda negatif lizis veren 20 serumu (%6.4) pozitif olarak değerlendirmiştir. Yine Yılmaz (24), fetal membranlarından etken izolasyonu yapılan bir koyunun aborttan 25 gün sonra alınan kan serumunda KFT ile pozitif reaksiyon tespit etmiştir. Andreani ve ark. (18), İtalya'nın bazı eyaletlerinde kitle halinde abortların hüküm sürdüğü koyun ve keçi sürülerinde 440 koyun ve 27 keçi kan serumunun KFT ile

araştırıldığını, koyunların %28' inin, keçilerin ise %33' ünün Klamidyoz bakımından reaktör bulunduğunu ve titrenin 1/16 olduğunu açıklamışlardır. Martinov (72), Bulgaristan'da 1978-1983 yılları arasında epidemik tarzda abortların çıktığını, plasenta kotiledonlarından iki *C. psittaci* suşunun izole edildiğini, yavru atan keçi kan serumlarının Klamidyoz bakımından KFT' nde 1/64-1/1024 sulandırılmalarda pozitif reaksiyon verdiklerinin tespit edildiğini; Roy ve Lamontagne (73), Kanada' da Quebec' te 3-4 yaşlı 353 koyun ile 98 keçi kan serumunu Klamidyoz bakımından KFT ile araştırdıklarını, koyunların %84' ü ile keçilerin %51' inin bu enfeksiyona karşı antikor taşıdıklarının anlaşıldığını, fakat bu hayvanlarda herhangi bir hastalık belirtisinin bulunmadığını; Kenar ve ark. (25), Konya bölgesinde koyunlarda atıklara sebep olan *Brucella*, *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Chlamydia*' ların prevalansını ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, 1063 koyun kan serumunda KFT ile Klamidyoz yönünden %17.3' lük bir oranda pozitiflik bulunduğunu ve enfeksiyöz abortuslar içerisinde birinci sırada yer aldığını bildirmişlerdir.

Doğal ve deneysel klamidy enfeksiyonlarına karşı gelişen antikorların KFT' nin yanında, indirek immünofloresan (49, 67), ELISA (6, 9, 21, 69, 74, 75, 76), nötralizasyon (77, 78, 79), hemaglutinasyon-inhibisyon ve aglutinasyon (75) testleriyle de ortaya konulabileceği bildirilmiştir.

Grup spesifik klamidyal antikorların teşhisinde ELISA' nın KFT' nden daha hızlı ve duyarlı olduğu bildirilmiştir (9, 75, 76, 80, 81). Ancak klamidy enfeksiyonları için standartlaştırılmış bir ELISA testi henüz mevcut değildir (7, 61). Milon ve ark. (81), koyun kan serumlarını enzootik koyun abortusu yönünden *C. trachomatis* suşundan hazırlanmış ticari bir antijen kullanarak ELISA ile test ettiklerinde; ELISA' nın KFT' nden daha duyarlı ve spesifik, indirek immünofloresan testi kadar değerli bulmuşlardır. Pepin ve ark. (76), *C. psittaci*' nin abort suşundan embriyolu tavuk yumurtasında hazırlanan bir antijen ile keçi serumlarını ELISA ve KFT ile incelemişler, sonuçların %80 uyumlu olduğunu, ancak ELISA' nın IgG' leri tespit etmede daha hassas olduğunu bildirmişlerdir. Cevenini ve ark. (80), koyunların enzootik abortusunda tarama testi olarak ELISA' dan yararlanılabileceğini, koyunlarda klamidyalara karşı oluşan antikorların ortaya konulmasında ELISA testi ile indirek immünofloresan testi arasında iyi bir korelasyon bulduklarını açıklamışlardır.

2.6. İmmünite

McCafferty (82), *Chlamydia* cinsinin bütün üyelerine karşı gelişen konakçı immünitesi üzerine yaptığı çalışmasında, *C. psittaci*'ye karşı gelişen humoral cevapta IgG₁ antikorlarının dominant olduğunu, fakat immün cevap mekanizmasının tam olarak aydınlatılmadığını, bu konuda büyük bir bilgi noksanlığının olduğunu açıklamıştır. Huang ve ark. (83), *C. psittaci*'ye karşı koyunların diz arkasına ait lenf yumrularının immün cevapları üzerine yaptıkları deneysel çalışmalarında, immünitede sıvısal ve hücrel bağışıklığın rol oynadığını bildirmişlerdir. Stamp ve ark. (11), hastalığa yakalanıp abort yapan koyunların takip eden gebeliklerinde abortların görülmediğini ve enfeksiyona dirençli olduklarını açıklamışlardır. Bazı araştırmacılar (46, 84), komplemanı fikse eden antikorların abortları önlemede etkisiz olduğunu tespit ettiklerini, fakat KFT'nde teşhis edilen bu antikorların, klamidyal cevabın bir göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Huang ve ark. (83), abort sonrasında komplemanı bağlayıcı antikor titrelerinin düşük olduğu koyunları enfeksiyona dirençli bulmuşlardır. Buzoni-Gatel ve ark. (85), *C. psittaci*'den ileri gelen plasental ve fetal enfeksiyonu önlemede antikorların rolünü araştırdıkları çalışmalarında; gebeliklerinin onbirinci gününde fareleri damar içi yolla poliklonal ve monoklonal antikorlarla immünize ettikten bir gün sonra, virulent AB₇ koyun abort suşunu farelere verdiklerinde yavru ölümlerinin azaldığını bildirerek, fetal kayıplara karşı direncin pasif olarak aktarılabilirliğini açıklamışlardır. Buxton ve ark. (86), enfekte koyunlardan gebeliğin 125. gününde alınan fetüslerin kan serumlarında *C. psittaci*'ye karşı gelişen IgM ve IgG antikorlarını tespit ederek, erken fetal bir immün cevabın varlığına da işaret etmişlerdir.

Enzootik koyun abortusunda hücrel immünitenin allerjik deri testi ile tespit edilmesi konusunda birçok çalışma yapılmıştır (21, 84, 87, 88), Wilsmore ve ark. (89), saha suşu ile enfekte edilen 28 koyun ve onların kontamine ortamda doğan 8 kuzusunun alt göz kapaklarına *C. psittaci* antijenini deri içi olarak uyguladıklarında, 15 koyun ve 2 kuzuda 72 saat sonra pozitif reaksiyon tespit etmişler ve kuzulardaki zayıf reaksiyonu hücrel immün cevap mekanizmalarının gelişmemesine bağlamışlardır. Deneysel enfeksiyondan 3-5 ay sonra da deri testi ile pozitif reaksiyonların teşhis edilmesi üzerine, hücrel immünitenin sıvısal immüniteden daha uzun sürdüğünü açıklamışlardır.

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık deri testi ile ortaya konan pozitif reaksiyonların koruyucu immünite ile ilgili olduğu açıklanmıştır (21, 88). Hastalıklı bir sürüde,

gebelik döneminde uygulanan allerjik deri testinde pozitif sonuç veren koyunların daha sonra abort yapmadıkları, negatif sonuç verenlerin ise abort yaptıkları gözlenmiş (88), çiftleşmeden önce uygulanacak deri testi ile hastalığa duyarlı ve dirençli hayvanların önceden teşhis edilebileceği bildirilmiştir (90). Dawson ve ark. (84), ağız yoluyla enfekte edilen koyunların deri testinde negatif sonuç vermelerini antijenik uyarımın yetersizliğine bağlamışlar, kuzulamadan altı hafta sonra tekrarladıkları testte klamidyemi sonucu gelişen yeterli antijenik uyarımla ilgili olarak pozitif reaksiyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

2.7. Kontrol

Koyunları enfeksiyondan korumak amacıyla çeşitli aşılar geliştirilip uygulamaya konulmasına rağmen, aşılama ile abortların önlenilebileceği, ancak enfeksiyonun tamamen ortadan kaldırılamayacağı bildirilmiştir (2, 7). Genellikle çiftleşmeden önce ve sürüye yeni katılan koyunların düzenli olarak aşılanması koşuluyla, üç yılda bir aşılama önerilmektedir (7, 62). Ancak Aitken ve ark. (62), hastalığa yakalanma riskinin yüksek olduğu yerlerde yıllık aşılama yapılmasının daha uygun olacağını bildirmişlerdir. Önceden enfeksiyonu almış veya risk altındaki koyunlarda, çiftleşmeden önce aşılama ile abort sayısının azaldığı, ancak enfeksiyona yeni yakalanan koyunların hepsinde abortların önlenemediği gözlenmiştir (8, 62).

Aşı konusunda ilk çalışmaları yapan McEwen ve ark. (44), enfekte yumurta sarı kesesi ve fotal membranlarından hazırladıkları formollü aşilar ile başarılı sonuçlar aldıklarını bildirerek, koç katımından önce sarı keseden hazırlanan aşının uygulandığı 1184 koyun üzerinde yaptıkları saha çalışmalarında abortus oranının %2.4' e kadar düştüğünü tespit etmişlerdir. Abortus oranındaki bu düşüş, aşılamayla ilgili olarak gelişen immünite ile etkenin fotal membranlara yerleşmesinin engellenmesine bağlanmıştır (47). Hastalığın kontrolünde yumurtada üretilen ve formolle inaktive edilen bir aşının İngiltere' de 1956 yılından beri kullanılmasına rağmen (91), aşıları sürülerde enzootik abortus salgınları tespit edilmiştir (92, 93). Güney-doğu İskoçya' da *C. psittaci* yle ilgili abortus oranını %7.6 olarak tespit eden Linklater ve Dyson (93), aşılanmış 13 sürüdeki bu oranın %6.5 olduğunu bildirerek, aşılamadaki

başarısızlığı; aşının saha suşuna karşı uzun süre koruyamamasına, aşılama hata olmasına, hayvanlardaki gizli enfeksiyondan dolayı yeterli bağışıklığın oluşmamasına ve aşının gücünü kaybetmesine bağlamışlardır. Yumurta sarı kesesinden hazırlanmış adjuvantlı ticari bir aşı ile aşıladıkları koyunları damar içi ve deri içi yolla eprüve eden Rodolakis ve Souriau (46), aşının damar içi uygulamaya karşı koyunları koruyamadığı halde, deri içi eprüve edilenlerde abort oranının azalmasına rağmen, vaginal yolla etkenin çıkarıldığını bildirmişlerdir. Aşılı koyunlarda görülen bu cevap farklılıklarının inokulasyon yoluyla ilgili olduğunu bildiren Rodolakis ve Souriau (46), deri içi yolla enfekte edilen koyunlarda, etkenlerin lenf yumrularına geçtiklerinde duyarlı hale gelmiş lenfositlerin ürettiği lenfokinlerin fagositik aktiviteyi artırarak, etkenlerin genel dolaşıma ve plasenta ile fetüse ulaşmadan fagositoz ile yok edildiğini açıklamışlardır. Yılmaz (79), çeşitli aşıları karşılaştırdığında; enfekte yumurta sarı keselerinden Tyrode eriyiğinde hazırlanan %10' luk süspansiyona %0.25 oranında alüminyum hidroksit katılmasıyla elde edilen canlı aşının, en iyi bağışıklığı oluşturduğunu tespit etmiştir.

Klamidyal etkenlerin tetrasiklinlere duyarlı olduğu ve tedavide kullanılabilecekleri bildirilmiştir (51, 94, 95, 96). Uzun süre etkili oksitetrasiklinin klamidyalardan çoğalmasını engelleyerek gebelik süresini uzattığı, abortus ve ölü doğum sayısını azalttığı tespit edilmiş olup, tedavi için iki hafta ara ile 20 mg/kg dozunda oksitetrasiklinin kas içi yolla iki kez uygulanması teklif edilmiştir (7). Greig ve Linklater (95), koyunların enzootik abort salgınlarını kontrol etmede uzun süre etkili oksitetrasiklin tedavisinin birbirini takip eden üç yıl boyunca 13 farklı sürüde etkisini kontrol etmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında; bileşiğin salgın karşısında kullanıldığı zaman, oksitetrasiklin muamelesine maruz bırakılmayan kontrol grubuna oranla muameleye maruz bırakılan koyunların abort oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir azalma meydana geldiğini, ancak enfekte olduğu önceden bilinen sürülerde ilacın uygulanması halinde tedavi edilen ve edilmeyen koyunlar arasında önemli bir farkın görülmediğini, bu nedenle salgın kontrolünde oksitetrasiklin tedavisinin kısa süreli bir tedbir olarak düşünülmesi gerektiğini, tedavinin sürüde enfeksiyonu eradike etmediğini açıklamışlardır.

Wilsmore ve ark. (21), *C. psittaci* A22 suşundan hazırlanan, formolle inaktive ve adjuvantlı bir aşı ile aşılanmış koyunları homolog suş ile çiftleşmeden 70 gün sonra ağız yoluyla eprüve ettiklerinde; hastalığa ait klinik bulgu tespit edemediklerini ve aşının koruyucu olduğunu ifade etmişlerdir. Gupta ve Galhotra (97), deneysel olarak *C. psittaci* ile enfekte edilen 2-3 haftalık buzağılara trimetoprim ve sulphamethoxazole içeren bir preparatın enfeksiyondan 5 gün sonra intramusküler olarak enjekte edilmesi halinde, deneysel enfeksiyonda görülen klinik semptom ve

hematobiyokimyasal değerlerin bazal değerlerine yakın olarak tersine çevrildiğini, tedavi edilen buzağuların tamamen iyileştiklerini bildirmişlerdir.

Koyunların enzootik abortusunda bulaşma çoğunlukla atıklar sırasında olduğundan, bulaşmanın derecesini azaltmak için bazı tedbirlerin alınması zorunludur (62). Önlem için; abort yapan koyunlara ait aborte fetüs ve fetal membranların dikkatlice toplanıp yok edilmesi ile birlikte, atık yapan koyunların 2-3 hafta kadar, yani uterus akıntıları kesilinceye kadar ayrı bir yerde tutulmaları gerektiği bilirmiştir (3, 7, 62).

Hastalığın eradikasyonu oldukça zordur. Eradikasyonda tek kesin çözümün koyunların kesilmesi olmasına rağmen, klamidyaların mera ve barınaklarda ne kadar süreyle kaldıkları konusu tartışmalıdır (62).

Bu çalışma, Konya bölgesinde abort yapan koyunlardan toplanan kan serumlarında KFT uygulanmak suretiyle klamidya enfeksiyonlarına karşı gelişen antikör varlığının tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Antijen

Araştırmada, Tarım ve Koyışleri Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (İstanbul)' nden sağlanan *C. psittaci* S 26/3 suşu ile enfekte edilen embriyolu tavuk yumurtalarının sarı keselerinden hazırlanan süspansiyon antijen olarak kullanıldı.

3.2. Serolojik Araştırmada Kullanılan Serumlar

Araştırmada, Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü' nden sağlanan abort yapmış koyunlara ait 224 adet koyun kan serumu kullanıldı.

Elde edilen bu kan serumu örnekleri 56°C' lik benmaride 30 dk süreyle inaktive edildi (70) ve sterilite kontrollerinden sonra kullanılmıncaya kadar -20°C' de dipfrizde saklandı. Dipfrizde saklanan serumlar, KFT' ne tabi tutulmadan önce tekrar aynı sıcaklık derecesinde 10 dk süreyle inaktive edildi.

3.3. Hemolitik Serum (Amboseptör)

Koyun eritrositlerine karşı immünize edilen tavşanlardan hazırlanan antiserumlar, hemolitik serum (amboseptör) olarak kullanıldı. Hemolitik serum, testte kullanılmadan önce 56°C' de 30 dk inaktive edildi ve 1 ml' lik miktarlar halinde ampullere dağıtılarak kullanılıncaya kadar dipfrizde saklandı (13).

3.4. Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları

KFT' nde kontrol olarak kullanılan bu serumlar, Moredun Veterinary Research Institute (England)' den sağlandı.

3.5. Komplement

Daha önce deneylerde kullanılmayan ve bir gün öncesinden aç bırakılan sağlam erkek kobaylardan elde edilen kan serumları, komplement olarak kullanıldı. Kobay kan serumları (komplement), titre edilinceye kadar +4°C' de saklandı (13).

3.6. Koyun Eritrosit Süspansiyonu

Eritrosit süspansiyonu için gerekli olan kan, koyunun vena jugularis' inden 20 cm³ lük steril plastik enjektörlerle Alsever Solüsyonu içine alındı ve daha sonra %5' lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı (13).

3.7. Araştırmada Kullanılan Solüsyonlar

3.7.1. Phosphate buffered saline (PBS) solüsyonu (98).

NaCl.....	8.00 g.
KCl.....	0.20 g.
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O.....	2.37 g.
KH ₂ PO ₄	0.20 g.
CaCl ₂	0.10 g.
MgCl ₂ x 6 H ₂ O.....	0.10 g.
Bidistile su.....	1000 ml

Kimyasal maddeler bidistile suda eritildi ve pH' sı 7.1' e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon daha sonra otoklavda 121°C' de 15 dk süre ile steril edildi.

3.7.2. Alsever solüsyonu (99).

Dekstroz.....	20.50 g.
Sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$)	8.00 g.
Sitrik asit ($C_6H_3O_7 \times H_2O$)	0.55 g.
NaCl.....	4.20 g.
Bidistile su.....	1000 ml

Kimyasal maddeler bidistile suda eritildi ve membran filtrasyon yöntemiyle sterilize edilerek +4°C' de saklandı.

3.8. Komplement Fiksasyon Testi (KFT)

3.8.1. Eritrosit süspansiyonunun hazırlanması

Koyunun vena jugularis' inden 20 cm³' lük steril enjektörle alınan kan, eşit miktarda Alsever solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra iyice çalkalandı ve 2000 devirde 15 dk süre ile santrifüj edildi (99, 100). Santrifüjlemeden sonra tüpün dibinde toplanan eritrositlerin üzerindeki solüsyon, pastör pipeti ile alınarak atıldı. Daha sonra eritrositler PBS ile üç kez yıkandı ve bu solüsyon ile %5' lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı (13, 70, 71, 99).

3.8.2. Hemolitik serum (amboseptör)' un hazırlanması

Koyun eritrositlerine karşı hiperimmün serum (hemolitik serum) elde etmede, 4 adet beyaz tavşan kullanıldı. Tavşanlara intravenöz yolla (kulak venası içine), %5' lik eritrosit süspansiyonundan belirli aralıklarla üç enjeksiyon yapıldı. Birinci enjeksiyonda 2.0 ml, birinci enjeksiyondan 5 gün sonra yapılan ikinci enjeksiyonda 1.5 ml ve ikinci enjeksiyondan 6 gün sonra yapılan üçüncü enjeksiyonda ise 1.0 ml %5' lik koyun eritrosit süspansiyonu enjeksiyonları yapıldı. Son enjeksiyonu takip eden yedinci günde, tavşanların kalplerinden steril enjektörlerle alınan kanları, steril deney tüpleri içerisine aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilerek koagülasyonu sağlandı. Bu süre sonunda koagülat, steril bir çubuk ile tüplerin iç çeperinden ayrıldı. 2 saat daha oda sıcaklığında, takiben bir gece +4°C' de buzdolabında bekletildikten sonra ayrılan serumlar, 3000 devirde 30 dk santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra serumlar, 56°C' lik benmaride 30 dk bekletilerek inaktive edildi ve elde edilen seruma koruyucu olarak %0.5 oranında fenik asit ilave edildikten sonra sterilite kontrolleri yapılarak -20°C' de saklandı (13).

3.8.2.1. Hemolitik serum (amboseptör)' un titrasyonu

Tablo 3.1.a' da görüldüğü gibi; A, B, C, VII, VIII, IX harf ve romen rakamlarıyla işaretlenen 6 adet deney tüpünde 1/100' den 1/6000' e kadar "Amboseptörün Ana Dilüsyonları" hazırlandı (13).

Tablo 3.1.a. Amboseptörün Ana Dilüsyonları

Tüpler	PBS (ml)	Amboseptör (ml)	Elde edilen dilüsyon
A	9.9	0.1 saf amboseptör	1/100
B	18	2.0 tüp A' dan	1/1000
C	8.0	4.0 tüp B' den	1/3000
VII	3.0	1.0 tüp B' den	1/4000
VIII	4.0	1.0 tüp B' den	1/5000
IX	5.0	1.0 tüp B' den	1/6000

"Amboseptörün Ana Dilüsyonları" hazırlandıktan sonra, ayrı bir sehpaye rakamla 1' den 9' a kadar işaretlenen 9 adet aglütinasyon tüpü dizildi. Sonra tüplerin içine Tablo 3.1.b' de gösterilen miktarlarda PBS ve amboseptörün ana dilüsyonlarından konularak karıştırıldı. Bu şekilde, amboseptörün 1/1000, 1/1200, 1/1500, 1/1800, 1/2000, 1/3000, 1/4000, 1/5000 ve 1/6000' lik test dilüsyonları hazırlandı.

Tablo 3.1.b. Amboseptörün Test Dilüsyonları

Aglütinasyon Tüp No	PBS (ml)	Amboseptör Ana Dilüsyonu (ml)	Elde edilen dilüsyon
1	-	1.50 tüp B' den	1/1000
2	0.25	1.25 tüp B' den	1/1200
3	0.50	1.00 tüp B' den	1/1500
4	0.67	0.83 tüp B' den	1/1800
5	0.75	0.75 tüp B' den	1/2000
6	-	1.50 tüp C' den	1/3000
7	-	1.50 tüp VII' den	1/4000
8	-	1.50 tüp VIII' den	1/5000
9	-	1.50 tüp IX' dan	1/6000

Daha sonra bütün tüplere 1/10 oranında sulandırılan komplementten 0.5 ml ve %5' lik koyun eritrosit süspansiyonundan da 0.5 ml konuldu ve 37°C' lik benmaride 30 dk süreyle tutularak sonuç okundu. Tam hemoliz (%100) gösteren en büyük hemolitik serum dilüsyonu, hemolitik serumun titresi olarak kabul edildi (37). Tam hemoliz veren en büyük dilüsyona, bir Minimal Hemolitik Doz (MHD) ya da bir Hemolitik Ünite adı da verilmektedir (37, 71). KFT ile komplement ve antijenin titrasyonunda, titreye karşılık gelen bu dilüsyonun 5 kat kuvvetlisi (5MHD) kullanıldı (13, 70, 71).

3.8.3. Komplementin hazırlanması

İhtiyaca göre bir gece aç bırakılan birkaç kobaydan steril şartlarda alınan kan, oda sıcaklığında 10-15 dk bekletilerek koagüle edildi. Bu süre sonunda koagülat, steril bir çubuk ile tüplerin iç çeperinden ayrıldı ve 30 dk daha oda sıcaklık derecesinde bekletilerek serumun iyice ayrışması sağlandı. Sonra, elde edilen serum 3000 devirde 15 dk süreyle santrifüj edilerek KFT' nde kullanılacak olan komplement hazırlandı (13).

3.8.3.1. Komplementin titrasyonu

Komplementin titrasyonu, Mitscherlich (70) ve Yılmaz (13) tarafından bildirilen tekniğin mikromodifikasyonu ile U tabanlı mikrotitrasyon tablası (mikropleyt)' nda¹ yapıldı.

KFT' nde kullanılacak olan komplementi titre etmek için, bir mikrotitrasyon tablası alınarak, tablanın bir sırasındaki gözler, 1' den 10' a kadar numaralandırıldı. Son 4 göz, sırayla negatif serum kontrol (N.S.K.), antijen kontrol (A.K.), hemolitik sistem kontrol (H.S.K.) ve PBS kontrol (PBS K.) gözleri olarak kullanıldı (Tablo 3.2).

¹ U tabanlı mikrotitrasyon tablası. Firma Greiner und Söhne, Nürtinger/Württ. Germany' den sağlandı.

Tablo 3.2. Komplementin Titrasyonu

Göz No	1	2	3	4	5	6	N.S.K	A.K	H.S.K	PBS K.
							7	8	9	10
Negatif, 1/4 dilüsyonda koyun serumu (µl)	10	10	10	10	10	10	10	-	-	-
PBS (µl)	20	30	40	45	50	55	30	30	40	80
2 ünite titresi bilinen (1/80) antijen (µl)	10	10	10	10	10	10	-	10	-	-
1/20 dilüsyonda komplement (µl)	40	30	20	15	10	5	40	40	40	-
Hemolitik Sistem (µl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Hazırlanan gözler içine, sırayla Tablo 3.2' de gösterilen miktarlarda inaktive edilmiş (60°C' de 30 dk) ve 1/4 oranında sulandırılmış klamidyozy yönünden negatif koyun serumu, PBS, 2 ünite titresi bilinen (1/80) antijen ve 1/20 oranında sulandırılmış komplement konularak, mikrotitrasyon tablasının üzeri toksik olmayan yapıştırıcı band¹ ile kapatıldı. Mikrotitrasyon tablası, bir sehpanın üzerine yerleştirilerek 20 dk oda sıcaklık derecesinde, takiben 30 dk 37°C' lik benmaride tutuldu. Sürenin tamamlanmasından sonra mikrotitrasyon tablası benmariden çıkarılarak üzerindeki yapıştırıcı band kaldırıldı ve bütün gözlerle, deney yürütülmekte iken zaman hesaplanarak bir kısım 5MHD' luk hemolitik serum ile bir kısım %5' lik koyun eritrosit süspansiyonu (hemolitik sistem)' nun deneye konulmaları gereken zamandan 30 dk önce bir deney tüpünde eşit miktarlarda karıştırılarak 37°C' lik benmaride 30 dk süreyle tutulmasıyla duyarlılaştırılmış hemolitik sistemden 20 µl konuldu. Tablanın üzeri tekrar yapıştırıcı band ile kapatıldıktan sonra yine 30 dk süreyle 37°C' lik benmaride tutularak sonuç okundu. Komplementin 1/20 dilüsyonunun tam hemoliz (%100) meydana getirdiği en büyük (dilüe) komplement dilüsyonunun bulunduğu göz tespit edildi ve bu gözde bulunan miktar, komplementin titresi olarak kabul edildi (37). KFT ve antijen titrasyonunda, titreye karşılık gelen bu miktarın 15 µl fazlası kullanıldı (13).

¹ Bu band, Cooke Engineering Company, Alexandria, U.S.A.' den sağlandı.

3.8.4. Antijenin titrasyonu

Antijenin titrasyonunda, Erdeğer (101) tarafından bildirilen ve modifiye edilerek uygulanan mikrotitrasyon metodundan yararlanıldı.

Titrasyon için, U tabanlı mikrotitrasyon tablasının ilk sırasındaki 7 adet göze, otomatik pipetle sırayla 100, 25, 25, 25, 25, 25, 25 µl PBS ve ilk sıradaki birinci göze 25 µl titresi tayin edilecek olan antijenden konuldu. Daha sonra otomatik pipet yardımıyla birinci gözde bulunan 1/5' lik antijen dilüsyonundan başlamak ve bunu izleyen gözlere 25'er µl taşımak suretiyle antijen, 1/320' ye kadar sulandırıldı (Tablo 3.3). Hazırlanan her bir antijen dilüsyonundan tablanın diğer bir sırasındaki 7 adet göze 10' ar µl taşındı. Sulandırmalar üzerine, 10' ar µl 1/4 oranında sulandırılan kuvvetli pozitif (4+) serum, 1/20 oranında sulandırılan komplementin titresine karşılık gelen miktarın 15 µl fazlası (45 µl komplement) ve sonra da 15'er µl PBS konuldu (Tablo 3.3). Titrasyonun doğru olarak değerlendirilmesi için, ayrıca antijen kontrol, pozitif serum kontrol (P.S.K.) ve komplement kontrol (K.K.) gözleri de hazırlandı. Antijen kontrol için bir göze, 10 µl 1/5' lik antijen dilüsyonu, 45 µl 1/20' lik komplement dilüsyonu ve 25 µl PBS; pozitif serum kontrol için bir göze, 10 µl 1/4' lük pozitif serum dilüsyonu, 45 µl 1/20' lik komplement dilüsyonu ve 25 µl PBS; komplement kontrol için ise, diğer bir göze 45 µl 1/20' lik komplement dilüsyonu ve 35 µl PBS konuldu. Mikrotitrasyon tablasının üzeri toksik olmayan yapıştırıcı band ile kapatılarak 20 dk oda sıcaklık derecesinde ve takiben 37°C' lik benmaride 30 dk süreyle tutuldu. Daha sonra bütün gözlere komplementin titrasyonunda açıklandığı gibi hazırlanan hemolitik sistemden 20' şer µl konularak üzeri band ile tekrar kapatıldı ve tabla 37°C' lik benmaride 30 dk süreyle tutularak sonuç okundu. %10 hemoliz (%90 sedimentasyon) veren antijen dilüsyonu, antijenin titresi (bir antijen ünitesi) olarak kabul edildi. KFT' nde 2 antijen ünitesi kullanıldı.

Tablo 3.3. Antijen Titrasyonu

Gözler	1	2	3	4	5	6	7
PBS (μ l)	100	25	25	25	25	25	25
Saf antijen (μ l)	25	-	-	-	-	-	-
Taşınan Miktar (μ l)		25	25	25	25	25	25
Dilüsyon oranı	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Antijen (μ l)	10	10	10	10	10	10	10
1/4 dilüsyonda, pozitif (4+) serum (μ l)	10	10	10	10	10	10	10
1/20 dilüsyonda, titre edilmiş komplement (μ l)	45	45	45	45	45	45	45
PBS (μ l)	15	15	15	15	15	15	15
Hemolitik sistem (μ l)	20	20	20	20	20	20	20

3.8.5. Komplement fiksasyon testinin yapılışı

KFT, Stamp ve ark. (71) tarafından pratiğe geçirilen, Mitscherlich (70) ve Yılmaz (13) tarafından uygulanan tekniğin mikromodifikasyonu ile yapılmıştır.

Koyunlardan yavru atımını takiben 3 hafta sonra alınan ve benmaride 56°C ' de 30 dk süreyle inaktive edilen kan serumu örnekleri, deney tüpleri içerisinde PBS ile 1/4 oranında sulandırıldı. Bu sulandırmalardan U tabanlı mikropleytin ilk sırasındaki gözlere 20 μ l konuldu. İlk sıranın altındaki gözlere çok kanallı otomatik pipet yardımı ile 10' ar μ l PBS konuldu. Çok kanallı otomatik pipet ile en üst sırada bulunan serum dilüsyonlarından başlamak ve ve daha alt sıradaki gözlere 10' ar μ l taşımak suretiyle serumlar, 1/512' ye kadar sulandırıldı (Tablo 3.4.a, Şk. 4.1).

Tablo 3.4.a. KFT Serum Dilüsyonlarının Hazırlanması

1. sıra

Gözler	1/4 dilüsyonda test serumu (μ l)	PBS (μ l)	Taşınan miktar (μ l)	Dilüsyon oranı
1	20	-		1/4
2	-	10	10	1/8
3	-	10	10	1/16
4	-	10	10	1/32
5	-	10	10	1/64
6	-	10	10	1/128
7	-	10	10	1/256
8	-	10	10	1/512

Tablo 3.4.b. Komplement Fiksasyon Testi

1.sıra

Gözler	Serum Dilüsyonu	Serum Miktarı (μ l)	1/40 dilüsyonda antijen (μ l)	1/20 dilüsyonda komplement (μ l)	PBS (μ l)	Hemolitik sistem (μ l)
1	1/4	10	10	45	15	20
2	1/8	10	10	45	15	20
3	1/16	10	10	45	15	20
4	1/32	10	10	45	15	20
5	1/64	10	10	45	15	20
6	1/128	10	10	45	15	20
7	1/256	10	10	45	15	20
8	1/512	10	10	45	15	20

Sulandırma işleminden sonra sırasıyla bütün gözlere, çok kanallı otomatik pipet yardımı ile, 10' ar μl 2 antijen ünitesi (1/40) oranında sulandırılan antijen, 45 μl 1/20' lik komplement dilüsyonu ve son olarak da 15 μl PBS ilave edildi. Ayrıca testin doğru olarak değerlendirilmesi için; antijen, komplement, hemolitik sistem, pozitif ve negatif serum kontrol gözleri de hazırlandı. Bunun için, antijen kontrol gözüne : 10 μl 1/5' lik antijen dilüsyonu, 45 μl 1/20' lik komplement dilüsyonu ve 25 μl PBS; komplement kontrol gözüne : 45 μl 1/20' lik komplement dilüsyonu ve 35 μl PBS; hemolitik sistem kontrol gözüne : 80 μl PBS; pozitif serum kontrol gözüne : 10 μl 1/4' lük pozitif serum dilüsyonu, 10 μl 1/5' lik antijen dilüsyonu, 45 μl 1/20' lik komplement dilüsyonu ve 15 μl PBS; negatif serum kontrol gözüne ise 10 μl 1/4' lük negatif serum dilüsyonu, 10 μl 1/40' lik antijen dilüsyonu, 45 μl 1/20' lik komplement dilüsyonu, ve 15 μl PBS konuldu. Bütün bu işlemlerden sonra mikropleyitin üzeri toksik olmayan özel bir band ile kapatılarak, 20 dk oda sıcaklık derecesinde ve takiben 30 dk 37°C' lik benmaride inkübasyona bırakıldı (13, 70, 71). Süre sonunda bütün gözlere yine çok kanallı otomatik pipet yardımı ile daha önceden komplementin titrasyonunda açıklandığı şekilde hazırlanan hemolitik sistemden 20 μl konuldu (Tablo 3.4.b). Mikropleyitin üzeri tekrar yapıştırıcı band ile kapatıldı ve 30 dk süreyle 37°C' lik benmaride tutulmasını takiben sonuçlar okundu. 1/16 ve daha yukarı serum dilüsyonlarında 2+' lık veya daha fazla (3+, 4+) fiksasyon veren kan serumları pozitif, 1/8 serum dilüsyonunda 2+' lık veya daha fazla fiksasyon veren kan serumları şüpheli, 1/8' den düşük serum dilüsyonlarında 2+'lık veya daha fazla fiksasyon veren ya da komplementi fikse etmeyen kan serumları ise negatif olarak değerlendirildi (71).

4. DENEY SONUÇLARI

4.1. Hemolitik Serum Titre Sonucu

Hemolitik serumun titresi, 1/3000 bulundu.

4.2. Komplement Titre Sonucu

Komplementin titreye karşılık gelen miktarı, 30 µl bulundu.

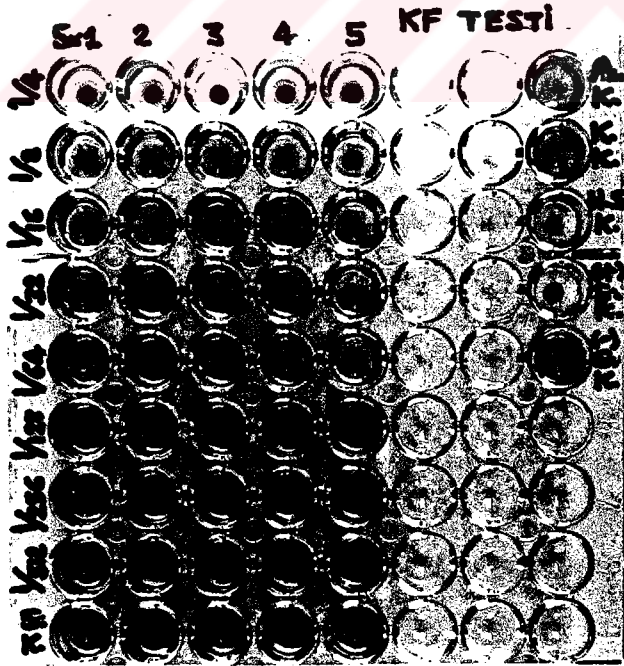
4.3. Antijen Titre Sonucu

Araştırmada kullanılan antijenin titresi (bir antijen ünitesi), 1/80 bulundu.

4.4. Komplement Fiksasyon Test Sonuçları

KFT ile klamidyal antikorlar yönünden araştırılan abort yapmış koyunlara ait 224 adet kan serumunun 45 adedi (%20) 1/16-1/32 serum dilüsyonlarında pozitif, 28 adedi (%12.5) ise 1/8 serum dilüsyonunda şüpheli bulundu. Geriye kalan 151 adet (%67.4) kan serumunda ise 1/8' den düşük antikor titreleri tespit edildi ve bu serumlar negatif olarak kaydedildi. Testte 1/16 ve daha yukarı serum dilüsyonlarında 2+' lık veya daha fazla (3+, 4+) fiksasyon veren kan serumları pozitif, 1/8 serum dilüsyonunda 2+' lık veya daha fazla fiksasyon veren kan serumları ise şüpheli olarak değerlendirildi. KFT' nin makroskopik görünümü Şekil 4.1' de gösterildi.

KFT ile kontrolü yapılan kan serumlarının serolojik sonuçları Tablo 4.1' de, seropozitif ve şüpheli olarak belirlenen kan serumlarının titreleri ve lokalite dağılımları ise Tablo 4.2' de verildi.



Şekil 4.1. KFT' nin makroskopik görünümü

Tablo 4.1. KFT ile klamidyal antikorlar yöntünden incelenen kan serumu örneklerinin serolojik sonuçları

Serumların temin edildiği yerler	KFT'ne tabi tutulan serumların sayısı	Pozitif Serumlar	Pozitif serumların yüzdesi (%)	Şüpheli serumlar	Şüpheli serumların yüzdesi (%)	Negatif serumlar	Negatif serumların yüzdesi (%)
İlgün ilçesi Dere Köyü	45	7	15.5	6	13.3	32	71.1
Çumra ilçesi köyleri	179	38	21.2	22	12.3	119	66.4
TOPLAM	224	45	20	28	12.5	151	67.4

Tablo 4.2. KFT ile belirlenen seropozitif ve şüpheli kan serumlarının titreleri ve lokalite dağılışı

Serum titreleri	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
İlgün ilçesi Dere köyü	6	6	1	-	-	-	-
Çumra ilçesi köyleri	22	37	1	-	-	-	-
TOPLAM	28	43	2	-	-	-	-

TARTIŞMA

Konya'nın Çumra ve Ilgın ilçeleri köylerinde 1993-1994 kuzulama sezonunda koyunlarda görülen abort olayları üzerine, Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nün abort yapan koyunlardan aldıkları 224 adet kan serumu alınarak, koyunların enzootik abortus etkeni *C. psittaci* ye karşı oluşan antikor varlığını tespit etmek amacıyla, KFT ile serolojik bir çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda, abort yapan koyunlardan alınan 224 adet kan serumunun 45' inde (%20) komplementi fikse eden antikorlar tespit edilmiştir.

Amerika, Avrupa, Avustralya ve Asya kıtalarındaki birçok ülkelerde (12, 57, 70, 71, 72, 73, 102) klamidyal enfeksiyonlarının varlığı ve yaygınlığı indirek olarak genellikle KFT ile ortaya konulmuştur.

Kanada'da Roy ve Lamontagne (73), Quebec' te 3-4 yaşlarındaki 353 koyun ile 98 keçi kan serumunu Klamidyoz bakımından KFT ile araştırdıklarını, koyunların %84' ü ile keçilerin %51' inin bu enfeksiyona karşı antikor taşıdıklarının anlaşıldığını, fakat bu hayvanlarda herhangi bir hastalık belirtisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. İngiltere' de Stamp ve ark. (71), abort yapan 146 koyunun 118' inde (%81.3) klamidyal etkenlere karşı komplementi fikse eden antikorlar tespit etmişler ve KFT' nde 1/16 ve daha yukarı titreleri enfeksiyonun kesin bulgusu olarak kabul etmişlerdir. Yılmaz ve ark. (12) tarafından, Andreani ve arkadaşlarının İtalya'nın bazı eyaletlerinde kitle halinde abortların hüküm sürdüğü koyun ve keçi sürülerinden aldıkları 440 adet koyun kan serumu ve 27 adet keçi kan serumunda klamidyal antikorları ortaya koymak için KFT ile yaptıkları çalışmalarında; koyunların %28' inde, keçilerin ise %33' ünde 1/16 ve daha yukarı titrelerde pozitif antikor varlığı tespit ettikleri bildirilmiştir. Yine Yılmaz ve ark. (12) tarafından, Perini ve arkadaşlarının İtalya'nın Ressio Emilia eyaletinde 35 koyun sürüsünden toplanan 371 kan serumunda klamidyal antikorların varlığını teşhis etmek için KFT ile yaptıkları çalışmalarında, 1/16-1/256 titreler arasında pozitif olgu tespit ettikleri ve enfeksiyon oranının %46.4 olduğu bildirilmiştir. Mitscherlich (70), Almanya' da herhangi bir abort olayı görülmeyen klinik olarak sağlıklı 13 değişik koyun sürüsüne ait 240 kan serumu ile abort olayları görülen bir sürüdeki ana koyunlardan aldığı 32 adet kan serumunda klamidyal antikor varlığını ortaya koymak için KFT ile yaptığı araştırmada; abort olayları görülmeyen koyunlardan aldığı 240 kan serumunun

hiçbirinde 1/8 ve yukarısında antikor titresi tespit edemediği halde, abort olayları görülen sürüdeki ana koyunlardan aldığı 32 adet kan serumunun 18' inde (%56.2) 1/8 ve yukarısında antikor titresi tespit ederek, pozitiflik sınırı olarak 1/8 ve yukarısındaki antikor titrelerini kabul etmiştir. Martinov (72), 1978-1983 yılları arasında Bulgaristan' ın epidemik tarzda abortlar meydana gelen altı bölgesindeki 167 keçiden ve enfeksiyondan etkilenmemiş 347 keçiden topladığı kan serumu örneklerinde klamidyal antikor varlığını göstermek için KFT ile yaptığı araştırmada; epidemik tarzda abortlar meydana gelen altı bölgenin ikisindeki 30 adet abort yapan keçinin 28' inde (%93.3) 1/32-1/1024 arasında antikor titresi, diğer dört bölgedeki koyunlarda %82 negatiflik tespit edildiğini ve enfeksiyondan etkilenmemiş 347 keçiden toplanan kan serumlarında ise çok düşük (1/2) antikor titresi tespit edildiğini bildirmiştir. Seaman (57), Avustralya' nın New South Wales eyaletinde iki farklı sürüde abort yapan koyunların fetüs ve plasentalarında klamidyaların izole ve identifiye edildiğini, bunlardan 200 melez dişi koyunlu ilk sürüdeki abort yapan 12 koyunun 8' inden abort tarihinden 2 hafta sonra alınan kan serumlarında KFT ile 1/40' dan 1/80' e kadar değişen titrelerde klamidyal antikor varlığının tespit edildiğini bildirmiştir. Hastiono ve ark. (102), Endonezya' da ruminantlarda *C. psittaci* ye karşı gelişen antikor titrelerini tespit etmek amacıyla, Endonezya Veteriner Bilimleri Araştırma Enstitüsü Serum Örneği Bankası' ndaki 1843 serum numunesi (1311 sığır, 286 buffalo, 78 koyun, 168 keçi serumu) ve Endonezya' nın çeşitli bölgelerine öğretim gezileri esnasında toplanmış olan 532 serum numunesi olmak üzere toplam 2375 serum numunesi üzerinde KFT ile yaptıkları çalışmalarında seropozitif hayvanların en yüksek yüzde oranlarını %36.5 (63 hayvandan 23' ü) ile Friesian Holstein sığırlarında, %29.2 (24 hayvandan 7' si) ile Sumba Ongole veya Ongole melez sığırlarında ve sırasıyla Bali sığırlarında %18.7 (16 hayvandan 3' ü), buffalolarda %20.3 (286 hayvandan 58' i), koyunlarda %19.2 (78 koyundan 15' i), keçilerde %16.1 (168 keçiden 27' si) bulduklarını ve *C. psittaci* ye karşı en yüksek antikor titresini (1/160) bir buffaloda tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Türkiye' de Yılmaz (13), patojen bir abort etkeninin izole edilemediği koyunlardan abort tarihinden 3 hafta sonra alınan 311 kan serumunu KFT ile klamidyal antikorlar yönünden inceleyerek, 1/8 ve daha yukarı sulandırmalarda titre veren 20 serumu (%6.4) pozitif, 1/4 sulandırmada titre veren 19 serumu (%6.1) şüpheli olarak değerlendirmiş, geriye kalan 272 kan serumunda (%87.4) ise ya 1/4' den düşük antikor titreleri tespit etmiş, ya da hiçbir klamidyal antikor varlığı tespit edememiştir. Arda (103), 1980-1986 yılları arasında Türkiye' de koyun ve keçi abortusları yönünden çeşitli serolojik testler ve bu arada KFT ile yapılan serolojik incelemelere göre, toplam 6679 serum örneğinin %11.7' sinin Brucella, %7.2' sinin

Campylobacter, %1.03' ünün Salmonella ve %3.35' inin Chlamydia yönünden pozitif antikor titrelerine sahip olduklarının tespit edildiğini bildirmiştir. Aynı yıllar arasında Konya ili ve ilçeleri ile Niğde ili ve ilçelerini kapsayan bölgelerde bakteriyolojik ve KFT ile yapılan serolojik incelemeler sonucunda abort yapan toplam 1100 koyun ve keçiden %22.2' sinin Bruselloz' lu, %12.7' sinin Kampilobakterioz' lu, %1.5' inin Salmonelloz' lu, %4.7' sinin de Klamidyoz' lu olduğu tespit edilmiştir (104). Kenar ve ark. (25), Konya bölgesinde koyunlarda atıklara sebep olan Brucella, Campylobacter, Salmonella ve Chlamydia' ların prevalansını ortaya koymak amacıyla yaptıkları bakteriyolojik ve serolojik çalışmalarında, atık yapan 1063 koyunda KFT ile Klamidyoz yönünden %17.3' lük bir oranda pozitiflik tespit edildiğini ve enfeksiyöz abortuslar içerisinde birinci sırada yer aldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, Konya' nın Çumra ve Iğın ilçeleri köylerindeki abort yapan koyunlarda KFT ile Klamidyoz yönünden genel olarak %20 oranında bir pozitiflik tespit edilmiş olup, serumların alındığı yerler dikkate alındığında bu pozitiflik oranının %15.5-%21.2 arasında bir dağılım gösterdiği gözlenmiştir.

Koyun, keçi ve sığırlarla, evcil ve yabani memelilerin geniş bir türünde abortlara neden olan *C. psittaci* enfeksiyonlarının indirek teşhisinde KFT' nden yararlanan Mitscherlich (70) ve Yılmaz (13, 24) 1/8 ve daha yukarı titreleri, Stamp ve ark. (71) ile Kenar ve ark. (25) 1/16 ve daha yukarı titreleri, Martinov (72) 1/32 ve daha yukarı titreleri, Seaman (57) 1/40 ve daha yüksek serum titrelerini pozitif olarak kabul etmişlerdir. KFT' nde 1/16 ve üzerindeki titreleri enfeksiyonun kesin bulgusu olarak kabul eden Stamp ve ark. (71), testin doğruluğunu tayin etmek için, enfeksiyonun varlığı bilinen bir sürüde ve fetal membranlarında elementer cisimciklerin tespit edildiği atık yapmış 146 koyundan, atıktan 6 hafta sonra aldıkları kan serumlarında pozitif titre oranını %81.8 olarak bulmuşlar ve bu titreleri, atıktan 4 ay sonra da tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da KFT' nde pozitiflik sınırı olarak, 1/16 ve daha yüksek serum titreleri kabul edilmiştir. Aitken (61), *C. psittaci* ve *Acinetobacter calcoaceticus* arasındaki antijenik kros reaksiyonlardan dolayı KFT' nde yanlış pozitif sonuçlar alınabileceğini, bu nedenle 1/32' den düşük titrelerin non-spesifik olarak kabul edilmesi gerektiğini belirtmiş olmakla beraber; koyunlarda görülen yavru atma olaylarında, *A. calcoaceticus*' un izole ve identifiye edildiğine dair yeterli bilgi mevcut değildir.

Deneysel olarak farklı yollarla enfekte edilen koyunların kan serumlarında komplemanı fikse eden antikorlar değişik zamanlarda teşhis edilmiştir. Damar içi 2-3 (49) veya 4-5 hafta (46), deri içi 3 (46) veya 4 hafta (51), deri altı ve tonsiller 55 gün (40), ağız 13 (84) veya 85 gün (40) ve rumen içi yolla inokule edilenlerde ise 85 gün (40) sonra komplemanı fikse eden antikorlar kan serumunda tespit edilmişlerdir. Bu

antikor titrelerinin; abortlar şekilleninceye kadar tedricen azaldığı, aborttan sonra tekrar yükseldiği bildirilmiştir (49, 52). Parker ve ark. (39), gebeliklerinin ortasında damar içi ve ağız yoluyla enfekte edilen 30 koyunun tamamında ve bu koyunlarla temas eden 30 koyunun 19' unda, inokülasyon ile kuzulamadan bir ay sonrası arasında komplementi fikse eden antikor titrelerinde artış tespit etmişler ve bu nedenle KFT ile koyunlardaki enfeksiyon hakkında bilgi sahibi olunabileceğini açıklamışlardır. Mitscherlich (70) ve diğer araştırmacılar (2,13, 71) tarafından KFT' nin bir sürüdeki salgının tespitinde çok büyük fayda sağlayan bir araştırma metodu olduğu, fakat bu test yardımıyla enfekte hayvanları atıktan önce ve kısa bir süre sonra kesin olarak tespit etmenin mümkün olmadığı, en yüksek KFT titrelerinin yavru atımından 3 hafta sonra ve takip eden aylarda elde edilebileceği açıklanmıştır. Bu çalışmada da, abort yapan koyunlardan abort tarihinden 3 hafta sonra alındığı bildirilen kan serumlarına KFT uygulanmıştır.

Aitken (7) ve Foggie (8), aşılı veya diğer klamidyal enfeksiyonlara sahip koyunlarda komplementi fikse eden antikor düzeylerinin genellikle düşük (1/2-1/4), *C. psittaci*' den kaynaklanan abort olaylarında ise antikor titrelerinin daha yüksek (1/32 ve daha yukarı) olduğunu açıklamışlardır. Bu çalışmada ise abort yapan koyunlardan alınan 224 adet kan serumunun sadece ikisinde 1/32 antikor titresi tespit edilmiş, daha yüksek antikor titreleri tespit edilememiştir. Ancak yüksek titrelili serumlarla fazlaca karşılaşılması, abort etkeninin *C. psittaci* olmadığını göstermez. Çünkü, alınan serum örneklerinde başka hastalıklara (Bruselloz, Salmonelloz, Kampilobakterioz, Listerioz, Border Disease, Akabane Disease vs. gibi) ait antikorlar olabileceği gibi, serumlar atık yapan koyunlardan hemen alınmış da olabilirler. Diğer taraftan serum titrelerinin düşük çıkması, koyunların aşılı olmasıyla ilgili olamaz; çünkü, ülkemizde *C. psittaci* enfeksiyonlarına karşı aşı uygulanmamaktadır.

Klamidyal enfeksiyonların indirek teşhisinde KFT' ne alternatif olarak birçok testler teklif edilmiş olmakla beraber, maalesef önerilen testler de mükemmel değildirler. Lewis ve ark. (75), KFT' ne alternatif olarak önerilen bu testleri Aglutinasyon, Radioizotop presipitasyon, Hemaglutinasyon-inhibisyon, İndirek hemaglutinasyon, İndirek floresan antikor, Nötralizasyon ve İndirek ELISA testleri olarak açıklamışlardır. Lewis ve ark. (75), bu testler içerisinde KFT' ne alternatif olabilecek en mükemmel testin ELISA olduğunu, diğer önerilen testlerin birçok hatalara sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, klamidyal antikorların teşhisi için standartlaştırılmış bir ELISA testi henüz mevcut değildir (7, 61). Pepin ve ark. (76), *C. psittaci*' nin abort suçundan hazırlanan bir antijen ile keçi serumlarını ELISA ve KFT ile incelemişler, sonuçların %80 uyumlu olduğunu, ancak ELISA' nın IgG' leri tespit etmede daha hassas olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiye' de de varlığı indirek olarak genellikle KFT ile ortaya konulan koyunların enzootik abortus etkeni *C. psittaci* enfeksiyonlarının Konya bölgesindeki varlığı, bir kez daha KFT ile ortaya konulmuştur. Ayrıca KFT ile yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen seropozitiflik oranının (%20) Kenar ve ark. (25) tarafından aynı bölgede 1988-1989 yıllarında KFT ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen seropozitiflik oranına (%17.3) yakın bulunması; Konya bölgesinde enfeksiyonun henüz eradike edilemediğini, bölgede abort olayları ile mücadelede, klamidyalardan kaynaklanan koyunların enzootik abortusu üzerinde önemle durulmasını ve bir an önce aşılama çalışmalarına başlanması gerektiğini göstermektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Aytuğ, C. N., 1990. Enfeksiyon Hastalıkları 2, "Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği", C. N. Aytuğ, E. Alaçam, Ü. Özkoç, B. C. Yalçın, H. Türker ve H. Gökçen, Tüm Vet. Hayv. Hiz. Yay. No: 2, 143-164, Teknografik Basımevi, İstanbul.
2. Güler, E., 1988. Koyun ve sığırlarda chlamydia enfeksiyonları ve Türkiye' deki durumu, Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., 6, 2, 167-187.
3. Arda, M., 1982. Klamidia enfeksiyonları, "Özel Mikrobiyoloji, Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar", M. Arda, A. Minbay ve N. Aydın, A. Ü. Vet. Fak. Yay., No:386, 613-626, A.Ü. Basımevi, Ankara.
4. Buxton, D., 1986. Potential danger to pregnant women of Chlamydia psittaci from sheep, Vet. Rec., 118, 510-511.
5. Crosse, B. A., Gomes, P., Muers, M. M., 1991. Ovine psittacosis and sarcoidosis in a pregnant woman, Thorax., 46, 8, 604-606.
6. Perez-Martinez, J. A., Schmeer, N., Storz, J., 1986. Bovine chlamydial abortion : Serodiagnosis by modified complement-fixation and indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked immunosorbent assay, Am. J. Vet. Res., 47, 7, 1501-1506.

7. Aitken, I. D., 1991a. Enzootic (Chlamydial) abortion, In "Diseases of sheep", Ed. W. B.Martin and I. D. Aitken, Second Edition, 43-49, Blackwells Scientific Publications, Oxford.
8. Foggie, A., 1977. Chlamydial infections in mammals, *Vet. Rec.*, 100, 315-317.
9. Fukushi, H., Hayashi, Y., Okuda, Y., Shimakura, S. and Hirai, K, 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Chlamydia psittaci* in animal sera, *Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.*, 50, 265-270.
10. Anderson, I. E., 1986b. Comparison of five ovine isolates of *Chlamydia psittaci* : an evaluation of three cell culture treatments, *Med. Lab. Sci.*, 43, 241-248.
11. Stamp, J. T., McEwen, A. D., Watt, J. A. A. and Nisbet, D. I., 1950. Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of diseases, *Vet. Rec.*, 62, 17, 251-254.
12. Yılmaz, S., Güler, E. ve Karaman Z., 1989. Ankara tiftik keçilerinde tespit edilen *Chlamydia psittaci* enfeksiyonu, *Etlık Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 6, 4, 1-11.
13. Yılmaz, S., 1962. Bardırma Merinos Çiftliği ile Tahirova Türk-Alman örnek çiftlikleri koyunlarında tespit edilen virusi abort vak' aları, *Etlık Vet. Bak. Enst. Derg.*, 1, 6, 460-470.
14. Hakiöglu, F., 1956. Almanya' da koyunlarda virusi abortus, *Türk Vet. Hek. Dern. Derg.*, 112-113, 2631-2637.

15. Hakioglu, F., 1958. Koyunların virusi abortusu, Türk Vet. Hek. Dern. Derg., 143-144, 77-84.
16. Martinov, S., Schoilev, C., Popov, G., 1989. Chlamydial abortion among sheep in Bulgaria, Monatshefte für Veterinärmedizin, 44, 11, 374-375.
17. Grigore, C., Darie, P., Popovici, V., Bragaru, F., Ciolca, A. and Mitroiu, P., 1964. Cerce tari asupra etiologiei avor turlor la oi, Lucr. ICVB Pasteur, 3, 265- 281.
18. Andreani, E., Poli, A., Tolari, F. and Bandecchi, P., 1983. Chlamydiosis in sheep and goats. Epidemiological survey of flocks in some Italian provinces, Clinica Veterinaria., 106, 10, 219-223.
19. Biolatti, B., Dagnall, G. J. R., Bollo, E., Cornaglia, E., Wilsmore, A. J. and Donn, A., 1991. The use of fluorescein-conjugated monoclonal antibodies, cell culture and transmission electron microscopy to detect *Chlamydia psittaci* and associated lesions in experimentally infected mice, J. Comp. Path., 105, 1, 17-26.
20. Anderson, I. E., 1986a. Comparison of virulence in mice of some ovine isolates of *Chlamydia psittaci*, Vet. Microbiol., 12, 213-220.
21. Wilsmore, A. J., Wilsmore, B. C., Dagnall, G. J, R., Izzard, K. A., Woodland, R. M., Dawson, M. and Venables, C., 1990. Clinical and immunological responses of ewes following vaccination with an experimental formalin-inactivated *Chlamydia psittaci* (ovis) vaccine and subsequent challenge with the live organism during pregnancy, Br. Vet. J., 146, 341-348.

22. Thiele, D., Wittenbrink, M. M., Fischer, D. and Krauss, H., 1992. Evaluation of the Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes, *Zbl. Bakt.*, 277, 446-453.
23. Ataman, B. ve Hakioglu, F., 1955. Eskişehir bölgesinde enzootik koyun virüsü abortusu bakımından araştırmalar, *Türk Vet. Hek. Dern. Derg.*, 110-111, 2531-2535.
24. Yılmaz, S., 1966. Türkiye' de sıkıt yapan bir koyunun kotiledonlarından izole edilen koyun abort virüsü (*C. ovis*), *Etlik Vet. Bak. Enst. Derg.*, 3, 1-2.
25. Kenar, B., Erganiş, O., Kaya, O. ve Güler, E., 1990. Konya bölgesinde koyunlarda atıklara sebep olan *Brucella*, *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Chlamydia*' ların bakteriyolojik ve serolojik incelenmesi, *Veterinarium*, 1, 1, 17-19.
26. Moulder, J. W., 1984. *Chlamydiaceae*, In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology " , Vol. I, Ed. N. R. Krieg and J. G. Hold, 729-739, Williams and Wilkins, Baltimore.
27. Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A., 1987. Review of Medical Microbiology., Seventeenth Ed. 306-313, Librairie du Liban, Lebanon.
28. Wyrick, P. B. and Richmond, S. J., 1989. Biology of chlamydiae, *JAVMA*, 195, 11, 1507- 1511.

29. Hobson, D., Johnson, F. W. A. and Byng, R. E., 1977. The growth of the ewe abortion chlamydial agent in McCoy cell culture, *J. Comp. Path.*, 87, 155-159.
30. Philips, H. L. and Clarkson, M. J., 1992. Culture of sheep chlamydia in a sheep fibroblast cell culture, *Res. Vet. Sci.*, 53, 2, 267-268.
31. Nanda, N. K., Rao, A. T., Nayak, B. C., Rao, A. G. and Mishra, P. R., 1992. Diagnosis of bovine chlamydial abortion in cattle, *Indian Vet. J.*, 69, 483-486.
32. Schachter, J., 1989. Chlamydial infections-past, present, future, *JAVMA*, 195, 11, 1501-1506.
33. Fukushi, H., Hirai, K., 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp.nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants, *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 42, 2, 306-308.
34. Serter, F. ve Serter, D., 1986. Klinik Viroloji. Genel Viroloji, Riketsiya ve Virus Enfeksiyonları, Üçüncü Baskı, E. Ü. Tıp Fak. Yay. No. 122, E. Ü. Basımevi, İzmir.
35. Matsuno, H., Fukushi, H., Yamaguchi, T. and Hirai, K., 1991. Antigenic analysis of feline and bovine *Chlamydia psittaci* with monoclonal antibodies, *J. Vet. Med. Sci.*, 53, 2, 173-179.
36. Schachter, J. and Caldwell, H. D., 1980. Chlamydiae, *Ann. Rev. Microbiol.*, 34, 285-309.

37. Bilgehan, H., 1990. Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi., Ders Kitabı : 452, Bornova, İzmir.
38. Akan, E., 1978. Özel Viroloji, Ders Kitabı, 38-68, Adana.
39. Parker, H. D., Hawkins, W. W. and Brenner, E., 1966. Epizootiologic studies of ovine virus abortion, Am. J. Vet. Res., 27, 119, 869-877.
40. Jones, G. E. and Anderson, I. E., 1988. Chlamydia psittaci : is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion ? , Res. Vet. Sci., 44, 260-261.
41. Appleyard, W. T., Aitken, I. D. and Anderson, I. E., 1985. Attempted venereal transmission of Chlamydia psittaci in sheep, Vet. Rec., 116, 20, 535-538.
42. Hadley, K. M., Carrington, D., Frew, C. E., Gibson, A. A. M., Hislop, W. S., 1992. Ovine chlamydiosis in an abattoir worker, Journal of Infection., 25, 105-109.
43. Storz, J., 1971. Chlamydia and Chlamydia Induced Diseases, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA.
44. McEwen, A. D., Stamp, J. T. and Littlejohn, A. I., 1951. Enzootic abortion in ewes. II. Immunization and infection experiments, Vet. Rec., 63, 11, 197-201.
45. Miller, M. A., Türk, J. R., Nelson, S. L., Lek, A. P. Van Der., Solorzano, R., Fales, W. H., Morehouse, L. G., Gosser, H. S., 1990. Chlamydial infection in aborted and stillborn lambs, J. Vet. Diagn. Invest., 2, 55-58.

46. Rodolakis, A. and Souriau, A., 1979. Clinical evaluation of a commercial vaccine against chlamydial abortion of ewes, *Ann. Rech Vet.*, 10, 1, 41-48.
47. McEwen, A. D., Littlejohn, A. I. and Foggie, A., 1951. Enzootic abortion in ewes. Some aspects of infection and resistance, *Vet. Rec.*, 63, 30, 489-492.
48. Johnson, F. W. A., 1983. Chlamydiosis, *Br. Vet. J.*, 139, 2, 93-101.
49. Fuensalida, D. E. and Rodolakis, A., 1978. Kinetics of the complement fixing and immunofluorescent antibody response in experimental chlamydiosis in ewes, *Ann. Rech. Vet.*, 9, 3, 505-516.
50. Khanna, R. N. S., Paul Gupta, R. K., Sadana, J. R. and Purohit, V. D., 1986. Certain clinical and haematological observations in experimental chlamydial abortion in ewes, *Indian J. Anim. Sci.*, 56, 10, 1001-1004.
51. Rodolakis, A., Souriau, A., Raynaud, J. P. and Brunault, G., 1980. Efficacy of a long-acting oxytetracycline against chlamydial ovine abortion, *Ann. Rech. Vet.*, 11, 4, 437-444.
52. Andreani, E., Poli, A., Tolari, F., Cerri, D., Farina, R. and Bandecchi, P., 1987. Experimental infection of sheep with *C. psittaci*, *Br. Vet. J.*, 143, 3, 221-225.
53. Brown, P. A. and Newman, J. A., 1989. Methods of chlamydial antigen detection, *JAWMA*, 195, 11, 1567-1570.

54. Johnson, F. W. A., Clarkson, M. J., Spencer, W. N., 1983. Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (*Chlamydia psittaci*) in cell cultures, *Vet. Rec.*, 113, 413-414.
55. Morgan, K. L., Wills, J. M., Howard, P. and Williams, R. L., 1988. Isolation of *Chlamydia psittaci* from the genital tract of lambs : A possible link with enzootic abortion of ewes, *Vet. Rec.*, 123, 399-400.
56. Rodolakis, A., Boulet, C. and Souriau, A., 1984. *Chlamydia psittaci* experimental abortion in goats, *Am. J. Vet. Res.*, 45, 2086-2089.
57. Seaman, J. T., 1985. *Chlamydia* isolated from abortion in sheep, *Aust. Vet. J.*, 62, 436.
58. Pearson, J. E., Gustafson, G. A., Senne, D. A. and Peterson, L. A., 1989. Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* from pet birds, *JAVMA.*, 195, 1564-1570.
59. Dagnall, G. J. R. and Wilsmore, A. J., 1990. A simple staining method for the identification of chlamydial elementary bodies in the fetal membranes of sheep affected by ovine enzootic abortion, *Vet. Microbiol.*, 21, 3, 233-239.
60. Storz, J., 1984. *Rickettsiae and chlamydiae*, In " Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology ", Ed. G. R. Carter, 4 th ed., 239-254, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
61. Aitken, I. D., 1990. Enzootic abortion of ewes, OIE Manual, Vol. II, (B/028), 12 rue de Prony-75017 Paris, France.

62. Aitken, I. D., Clarkson, M. J. and Linklater, K., 1990. Enzootic abortion of ewes, *Vet. Rec.*, 126, 136-138.
63. Nabeya, M., Kaneko, K., Ogino, H., Nakabayashi, D., Watanabe, T., Murayama, J., Hayashi, K., Fukushi, H., Yamaguchi, T., Hirai, K., Inaba, Y., Matumoto, M., 1991. Abortion in Japanese cows caused by *Chlamydia psittaci*, *Vet. Microbiol.*, 29, 3-4, 261- 265.
64. Fukushi, H. and Hirai, K., 1988. Immunochemical diversity of the major outer membrane protein of avian and mammalian *Chlamydia psittaci*, *J. Clin. Microbiol.*, 26, 4, 675-680.
65. Rodolakis, A. et Chancerelle, L., 1977. Dénombrement direct à l'isolement de *Chlamydia psittaci* au moyen de la technique des plages de lyse, *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128 B, 81-85.
66. Andersen, A. A., 1991. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test, *J. Clin. Microbiol.*, 29, 4, 707-711.
67. Rodolakis, A., 1988. Diagnostic de la Chlamyidiose abortive, *Ann. Rech. Vét.*, 19, 213-220.
68. Wilsmore, A. J. and Davidson, I., 1991. "Clearview" rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection, *Vet. Rec.*, 128, 503-504.

69. Souriau, A. and Rodolakis, A., 1986. Rapid detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal swabs of aborted ewes and goats by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), *Vet. Microbiol.*, 11, 251-259.
70. Mitscherlich, E., 1955. Beiträge zum Virusabort des Schafes II. Mitteilung : Epidemiologie, Seuchenbild und Diagnose des Virusabortes der Schafe, *Vet. Med. Nachrichten.*, 1, 129-145.
71. Stamp, J. T., Watt, J. A. A. and Cockburn, R. B., 1952. Enzootic abortion in ewes. Complement fixation test, *J. Comp. Path.*, 62, 93-101.
72. Martinov, S., 1984. Role of chlamydia infection in mass abortion in goats, *Veterinarnomedilinski Navki.*, 21, 5, 33-40.
73. Roy, R., Lamontagne, L., 1984. Serological prevalence of chlamydiosis in sheep and goats in Quebec, *Median Veterinaire du Quebec.*, 14, 1, 13-17.
74. Evans, R. T., Chalmers, W. S. K., Woolcock, P. R., Farmer, H. and Taylor-Robinson, D., 1983. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of chlamydial antibody in duck sera, *Avian Pathology.*, 12, 117-124.
75. Lewis, V. J., Thacker, W. L. and Mitchell, S. H., 1977. Enzyme-linked immunosorbent assay for chlamydial antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, 6,5, 507-510.

76. Pepin, M., Bailly, L., Souriau, A. and Rodolakis, A., 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of chlamydial antibodies in caprine sera, *Ann. Rech. Vet.*, 16, 4, 393-398.
77. McEwen, A. D. and Foggie, A., 1954. Enzootic abortion of ewes. Comparative studies of different vaccines, *Vet. Rec.*, 66, 28, 393-397.
78. McEwen, A. D. and Foggie, A., 1956. Enzootic abortion in ewes. Prolonged immunity following the injection of adjuvant vaccine, *Vet. Rec.*, 68, 686-690.
79. Yılmaz, S., 1968. Koyun virüsü abortüsü ve mücadelesi, *Etlık Vet. Bak. Enst. Derg.*, 3, 5-6, 31-33.
80. Cevenini, R., Moroni, A., Sambri, V., Perini, S. and La Placa, M., 1989. Serological response to chlamydial infection in sheep, studied by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting, *FEMS Microbiol. Immun.*, 47, 459-464.
81. Milon, A., Pellerin, J. L., Geral, M. F., Perol, S. et. Lautie, R., 1985. Sérologie de la chlamydie ovine par le test E. L. S. A. utilisation d'un antigène commercial préparé à partir d' une souche de *Chlamydia trachomatis*, *Revue Méd. Vét.*, 136, 1, 13-24.
82. McCafferty, M. C., 1990. Immunity to *Chlamydia psittaci* with particular reference to sheep, *Vet. Microbiol.*, 25, 87-99.

83. Huang, H. S., Tan, T. W., Buxton, D., Anderson, I. E. and Herring, A. J., 1990. Antibody response of the ovine lymph node to experimental infection with an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*, *Vet. Microbiol.*, 21, 345-351.
84. Dawson, M., Zaghoul, A. and Wilsmore, A. J., 1986. Ovine enzootic abortion: experimental studies of immune responses, *Res. Vet. Sci.*, 40, 1, 59-64.
85. Buzoni-Gatel, D., Bernard, F., Andersen, A. and Rodolakis, A., 1990. Protective effect of polyclonal and monoclonal antibodies against abortion in mice infected by *Chlamydia psittaci*, *Vaccine*, 8, 342-346.
86. Buxton, D., Barlow, R. M., Finlayson, J., Anderson, I. E. and Mackellar, A., 1990. Observation on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep, *J. Comp. Path.*, 102, 221-237.
87. Rodolakis, A., Dufrenoy, J. et. Souriau, A., 1977. Diagnostic allergique de la chlamydie abortive de la chevre, *Ann. Rech. Vet.*, 8, 3, 213-219.
88. Wilsmore, A. J., Dawson, M., Arthur, M. J. and Davies, D. C., 1986. The use of a delayed hypersensitivity test and long-acting oxytetracycline in a flock affected with ovine enzootic abortion, *Br. Vet. J.*, 142, 6, 557-561.
89. Wilsmore, A. J., Abduljalil, S. A., Parson, V. H. and Dawson, M., 1984. Observations on a skin sensitivity test for ovine enzootic abortion, *Br. Vet. J.*, 140, 5, 468-477.

90. Wilshire, A. J., Dawson, M., Trower, C. J., Venables, C. and Arthur, M. J., 1986. Ovine enzootic abortion : Field observations on naturally acquired and vaccine-elicited delayed type hypersensitivity to *Chlamydia psittaci* (ovis), *Vet. Rec.*, 118, 12, 331-332.
91. Foggie, A., 1973. Preparation of vaccines against enzootic abortion of ewes. A review of the research work at the Moredun Institute, *Vet. Bull.*, 43, 11, 587-590.
92. Anderson, I. E., Tan, T. W., Jones, G. E. and Herring, A. J., 1990. Efficacy against ovine enzootic abortion of an experimental vaccine containing purified elementary bodies of *Chlamydia psittaci*, *Vet. Microbiol.*, 24, 21-27.
93. Linklater, K. A. and Dyson, D. A., 1979. Field studies on enzootic abortion of ewes in south east Scotland, *Vet. Rec.*, 105, 387-389.
94. Aitken I. D., Robinson, G.W. and Anderson, I. E., 1982. Long-acting oxytetracycline in the treatment of enzootic abortion of ewes, *Vet. Rec.*, 11, 446.
95. Greig, A. and Linklater, K. A., 1985. Field studies on the efficacy of a long acting preparation of oxytetracycline in controlling outbreaks of enzootic abortion of sheep, *Vet. Rec.*, 117, 627-628.
96. Greig, A., Linklater, K. A. and Dyson, D. A., 1982. Long-acting oxytetracycline in the treatment of enzootic abortion of ewes, *Vet. Rec.*, 11, 445.

97. Gupta, M. P. and Galhotra, A. P., 1988. Therapeutic trials of experimental chlamydiosis in crossbred calves, *Indian J. Anim. Sci.*, 58, 6, 640-644.
98. Dulbecco, R. and Vogt, M., 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, *J. Exptl. Med.*, 99, 167-182.
99. Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B., Wittmann, G., 1977. *Virologische Arbeitsmethoden Band II. Ed. 1, Gustov Fischer Verlag, Stuttgart, New York.*
100. Afsal, H., 1975. Türkiye' de sığırlarda parainfluenza-3 hastalığı üzerinde araştırmalar, A. Ü. Vet. Fak. Dok. Tezi, Ankara.
101. Erdeğer, J., 1987. Komplement Sistemi, *Etlık Vet. Mikrobiol. Derg.*, 6, 1, 151-193.
102. Hastiono, S., Subiyanto., 1990. Antibody titres to *Chlamydia psittaci* in ruminants in Indonesia, *Penyakit Hewan*, 22, 39, 45-49.
103. Arda, M., 1987. Koyunlarda önemli yavru atma hastalıkları ve korunma yolları, *Koyun Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Sempozyumu.*, 11-12 Mayıs, Konya.
104. Baysal, T., 1987. Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü' nün Koyun Hastalıkları ve Yavru Atma Yönünden Yaptığı Çalışmalar, *Koyun Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Sempozyumu.*, 11-12 Mayıs, Konya.