

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

MARMARA BÖLGESİNDE RUMİNANT
ABORTLARINDA *CHLAMYDIA ABORTUS*'UN REAL TIME
PCR İLE TEŞHİSİ VE MULTİLOKUS VNTR ANALİZİ İLE
GENOTİPLENDİRİLMESİ

MEHMET ENGİN MALAL
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-18032 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Mehmet Engin MALAL tarafından hazırlanan “Marmara Bölgesinde Ruminant Abortlarında *Chlamydia abortus*’un Real Time PCR ile Teşhisi ve Multilokus VNTR Analizi ile Genotiplendirilmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/07/2020

Üye	:	Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	:	Prof. Dr. Mehmet AKAN	Ankara Üniversitesi
Üye(T.D.):	:	Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	:	Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ	İstanbul İstinye Üniversitesi
Üye	:	Doç Dr. Nural EROL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdür V.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN, ve diğer öğretim üyelerine ve çalışmamdaki yardımlarından dolayı İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü çalışanlarından Dr. Gülseren YILDIZ ÖZ, Dr. Belinda AYDIN, Dr. Mustafa Sencer KARAGÜL, Dr. Esra SATIR, Demet AYDOĞAN, Dr. Eray ATIL, Orbay SAYI, Gürkan ŞİMŞEK ve desteğini esirgemeyen kurum müdürüm Dr. Fahriye SARAÇ ve teknik koordinatör Dr. Ayşe ATEŞOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için değerli eşim Nuray MALAL ve biricik oğlum Engin Ege MALAL'a ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	4
2.2. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü.....	6
2.3. Antijenik Yapısı.....	7
2.3.1. Lipopolisakkarit	7
2.3.2. Major Dış Membran Proteini	7
2.3.3. Polimorfik Dış Membran Proteinleri.....	8
2.3.4. Kazaince Zengin Dış Zarf Proteinleri.....	8
2.3.5. Isı Şok Proteinleri.....	8
2.3.6. Glikolipid Antijenleri.....	9
2.4. Epidemiyolojisi.....	10
2.4.1. Konakçı Dağılımı.....	10
2.4.2. Etkenin Dayanıklılığı.....	10
2.4.3. Hastalığın Dünyadaki Durumu.....	10
2.4.4. Hastalığın Türkiye'deki Durumu.....	11
2.4.5. Enfeksiyon ve Bulaşma.....	12
2.5. Patogenez.....	14
2.6. Klinik Belirtiler.....	15
2.7. Aşılar ve Bağışıklık.....	16
2.8. Zoonotik Önemi.....	18

2.9. Teşhis.....	19
2.9.1. Serolojik Testler.....	19
2.9.2. Boyama Yöntemleri.....	20
2.9.3. Antijen Tespiti.....	22
2.9.4. Moleküler Yöntemler.....	22
2.9.5. İzolasyon.....	25
2.10. Tedavi ve Kontrol.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Örneklerin Toplanması.....	27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.1.3. DNA Ekstraksiyon Kiti.....	28
3.1.4. Mastermiks Kitleri.....	28
3.1.5. Agar Jel Elektroforez.....	29
3.1.6. Çözelti ve Tamponlar.....	29
3.1.6.1. Fosfat Tamponlu Tuz.....	29
3.1.6.2. TAE.....	29
3.1.7. Primer ve Problar.....	29
3.1.8. Referans Kontroller.....	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	32
3.2.2. Real Time PCR	33
3.2.2.1. Tespit Limitinin Belirlenmesi.....	33
3.2.2.2. Örneklerin Real Time PCR İncelenmesi.....	33
3.2.3. MLVA.....	35
3.2.3.1. PCR.....	36
3.2.3.2. Agaroz Jel Elektroforez.....	37
3.2.3.3. Kapiller Elektroforez.....	38
3.2.4. Sekans Analizi.....	38
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR	40
4.1. Real Time PCR	40
4.1.1. Analizin Tespit Limitinin Belirlenmesi	40

4.1.2. Örneklerin İncelenmesi.....	41
4.2. İstatistiksel Analiz.....	43
4.3. MLVA.....	43
4.4. Sekans Analizi.....	45
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	55
Ek 1 (PEV-HADYEK Kararı)	69
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BGM	: Buffalo green monkey
BHK	: Baby hamster kidney
CFT	: Komplement fikzasyon testi
CPAF	: Proteaz / proteozom benzeri aktivite faktörü
CT	: Cycle threshold
EB	: Elementer cisimcik
FAT	: Floresan antikor testi
İfu	: İnkluzyon şekillendiren ünite
IgG	: İmmunglobulin G
IgM	: İmmunglobulin M
LPS	: Lipopolisakkarit
MHC	: Major histokompatibilite kompleks
MLVA	: Multilokus VNTR Analizi
MOMP	: Major dış membran proteini
OIE	: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
Omp	: Dış membran proteini
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
POMP	: Polimorfik dış membran proteini
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RB	: Retiküler cisimcik
RFLP	: Restriction fragment length polimorfizm
rRNA	: Ribozomal RNA
Snp	: Tek nükleotit polimorfizmi
VNTR	: Variable number tandem repeat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	<i>C. abortus</i> 'un yaşam döngüsü.....	7
Şekil 2.	Enfeksiyon ve bulaşma yolları.....	13
Şekil 3.	<i>C. abortus</i> S26/3 DNA'sının dilüsyonlarının amplifikasyon eğrileri.....	40
Şekil 4.	Standart suşun dilüsyonlarının CT değerleri.....	41

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Enfekte hücrede inklüzyon cisimciği içerisinde elementer ve retiküler cisimcikler.....	21
Resim 2.	<i>C. abortus</i> enfeksiyonunda histopatolojik görünümler.....	22
Resim 3.	Alu 1 restriksiyon enzimi kullanılarak yapılmış RFLP analizi.....	23
Resim 4.	<i>C. abortus</i> S26/3 suşunun MLVA profilinin agaroz jel görünümü.....	44
Resim 5.	CAB267 gen bölgesi 212 bp büyüklükte bulunan bir suşun sekans analizi.....	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Çalışma örneklerinin illere ve hayvan türlerine göre dağılımı.....	27
Tablo 2.	Real Time PCR Analizi primer ve prob özellikleri.....	30
Tablo 3.	MLVA primer özellikleri.....	30
Tablo 4.	Sekans analizleri için primer özellikleri.....	31
Tablo 5.	Real Time PCR mastermiks karışımı.....	34
Tablo 6.	Real Time PCR amplifikasyon koşulları.....	34
Tablo 7.	Multilokus VNTR analizinde <i>C. abortus</i> S26/3 için primer bağlanma bölgeleri ve ampikon büyüklükleri.....	35
Tablo 8.	MLVA için gen bölgeleri, tekrar üniteleri ve olası ampikon büyüklükleri.....	36
Tablo 9.	Konvansiyonel PCR amplifikasyon koşulları.....	37
Tablo 10.	Tekrar sayılarına göre genotipik sınıflandırma.....	38
Tablo 11.	Hayvan türlerine ve illere göre Real Time PCR sonuçları.....	42
Tablo 12.	Küçük ruminantlardaki Real Time PCR analizi sonuçları.....	43
Tablo 13.	Real Time PCR sonuçlarındaki farklılıkların istatistiki değerlendirmesi...	43
Tablo 14.	<i>C. abortus</i> genotiplerinin hayvan türlerine göre dağılımı.....	44
Tablo 15.	Hayvan türlerine göre genotipik sınıflandırma.....	45
Tablo 16.	<i>C. abortus</i> S26/3 suşunun MLVA gen bölgelerinin sekans dizinleri.....	45

ÖZET

MARMARA BÖLGESİNDE RUMİNANT ABORTLARINDA *CHLAMYDIA ABORTUS*'UN REAL TIME PCR İLE TEŞHİSİ VE MULTİLOKUS VNTR ANALİZİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Malal, ME. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Chlamydia abortus insanlarda ve birçok hayvan türünde hastalığa sebep olan Gram negatif, zorunlu hücre içi, zoonoz bir bakteridir. *C. abortus*'un ruminantlarda sebep olduğu enzootik abort hastalığı hemen hemen tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Ülkemizde *C. abortus*'un, abortif etkenler içerisindeki yerini gösterecek geniş çapta bir çalışma yapılmamış olmakla birlikte; etkenin genotipleriyle ilgili yayınlanmış herhangi bir veri de bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Marmara Bölgesi'ndeki ruminant abortlarında *C. abortus*'un teşhisini yapmak ve etkenin genotiplerini belirleyerek bu anlamda ulusal ilk epidemiyolojik veriyi elde etmektir. Bu amaçla 12 ilden 267'si sığır, 380'i koyun, 70'i keçi, 13'ü mandaya ait toplam 730 abort materyali (fötal iç organlar, cenin mide sıvısı, plasenta, kotiledon, vaginal sıvı) *C. abortus* yönünden incelendi. Çalışmada, abort materyalinden, düşük tespit limitine sahip, tür spesifik Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) metodu ile etken DNA'sı araştırıldı. Pozitif sonuçlara ait DNA'lar Multilocus Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA) yöntemi ile genotiplendirildi. 730 materyalden 87 (%11.9) tanesi *C. abortus* yönünden pozitif bulundu. Pozitiflik oranları keçilerde %21.4, koyunlarda %16.6, mandalarda %7.7 ve sığırlarda %3 olarak tespit edildi. Genotiplendirme sonucunda hâkim genotip MLVA genotip 2 (%93.1) olarak bulundu ve genotip 3, 4, ve 5 ile birlikte toplam 4 farklı genotipin enfeksiyonlarda rol aldığı görüldü. Bu çalışma ile ülkemizde ilk kez *C. abortus*'un genotiplendirilmesi yapılırken; bir manda fetusunda *C. abortus* tespit edildi. Ayrıca Marmara Bölgesi'nde *C. abortus*'un özellikle küçük ruminant abortlarının önemli bir kısmından sorumlu olduğu belirlendi. Etkenin zoonotik olması ve yaygın görülmesi sebebi ile ulusal strateji planı hazırlanmasının gerekliliği ve yurdumuzda diğer bölgelerde yapılacak benzer çalışmaların da etkenin yaygınlığının ve genotiplerinin ulusal çapta belirlenmesine katkı sağlayacağı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: *Chlamydia abortus*, genotyping, MLVA, Real Time PCR, VNTR.

ABSTRACT

DIAGNOSIS OF *CHLAMYDIA ABORTUS* BY REAL TIME PCR IN RUMINANT ABORTIONS IN THE MARMARA REGION AND GENOTYPING WITH MULTILOCUS VNTR ANALYSIS

Malal ME. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Microbiology Program, PhD Thesis, Aydın, 2020.

Chlamydia abortus is a Gram negative, obligate intracellular, zoonotic bacteria that causes disease in many animal species and humans. Enzootic abortion caused by *C. abortus* in ruminants is common almost all over the world. There is no extensive studies to show the place of *C. abortus* in abortive agents and no published data about the genotypes of the agent in our country. The aim of this study is to diagnose *C. abortus* in ruminant abortions in the Marmara Region and to determine the genotypes of the agent and obtain the first national epidemiological data in this sense. For this purpose, a total of 730 abortion materials (fetal tissues, fetal stomach contents, placentas, cotyledons, vaginal swabs) of 267 cattle, 380 sheep, 70 goats, 13 buffaloes were examined for *C. abortus*. In this study, DNA of the agent was investigated from abort materials by species specific Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) with low detection limit. DNAs of positive results were genotyped by Multilocus Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA) method. From 730 materials, 87 (11.9%) were found positive for *C. abortus*. Positivity rates were 21.4% in goats, 16.6% in sheep, 7.7% in buffaloes and 3% in cattle. As a result of genotyping, the dominant genotype was found as MLVA genotype 2 (93.1%), and a total of 4 different genotypes with genotypes 3, 4, and 5 were involved in infections. With this study, genotyping of *C. abortus* and detection of the agent in a buffalo was done for the first time in our country. It was also determined that *C. abortus* was responsible for a significant part of small ruminant abortions in the Marmara Region. As the agent is zoonotic and widespread, it was concluded that the necessity of preparing a national strategy plan and similar studies in other regions of our country will contribute to the determination of the prevalence and genotypes on a national scale.

Keywords: *Chlamydia abortus*, genotyping, MLVA, Real Time PCR, VNTR.

1. GİRİŞ

Chlamydia abortus ruminantlarda özellikle de koyun ve keçilerde abortla seyreden, “Klamidiyozis” veya “Enzootik Abortus” olarak adlandırılan hastalığa neden olur (Szeredi ve Bacsadi 2002; Givens ve Morally, 2008). Hastalık; koyun ve keçilerde gebeliğin genellikle son 2-3 haftasında görülen abort, prematüre doğum, düşük canlı ağırlıkta, zayıf yavru doğumu ve canlı olarak dünyaya gelen yavrunun 48 saat içerisinde ölmesi ile karakterizedir (Givens ve Morally, 2008).

Hastalık sürü içerisinde periyodik aralıklarla tekrarlar ve enzootik seyirli olan bu hastalığı kontrol altına almak oldukça zordur. Hastalık nedeniyle görülen kuzu ve oğlak kayıpları, hasta hayvanların tedavi giderleri ve süt verimindeki azalma gibi faktörler dikkate alındığında çok önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Longbottom ve ark, 2002; Carter ve Wise, 2004). Etken koyun ve keçilerden başka, sığırlarda, domuzlarda da abortlara neden olur. Ayrıca insanların da hastalığa duyarlı olması ve düşüklere sebep olması açısından halk sağlığı riski oluşturmaktadır (Ward, 2006).

Etken dünyanın birçok bölgesinde koyun ve keçi abortlarının en önemli sebebidir ve endemik seyir gösterir (Essig ve Longbottom, 2015). Durum ülkemizin sınır komşuları için de benzerdir. Yapılan moleküler çalışmalarda; Bulgaristan’da görülen küçük ruminant abortlarının %35.8 gibi çok yüksek bir oranının *C. abortus*’tan kaynaklandığı ortaya konulmuştur (Simeonov ve Chilingirova, 2018). İran’da yapılan çalışmalarda küçük ruminant abortlarında %11.0 ile %38.0 arasında değişen oranlarda *C. abortus* tespiti yapılmıştır (Ebadi ve ark, 2015; Barati ve ark, 2017; Heidari ve ark, 2017). Yunanistan’da yapılan serolojik çalışmada koyunlarda %14.9, keçilerde %21.2 oranında pozitiflik belirlenirken (Bisias ve ark, 2010), genotipik olarak tüm dünyadan ayrışan 2 farklı suş tespit edilmiştir (Siarkau ve ark, 2002; Laroucau ve ark, 2009).

C. abortus genetik açıdan çok homojen bir türdür. *C. abortus*’un genotiplendirilmesinde en çok tercih edilen yöntemler Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST) ve MLVA’dır. Bu yöntemlerden MLST yöntemi *C. abortus*’u 5 farklı genotipe ayırabilirken, MLVA ile 7 farklı genotip elde edilebilmektedir (Siarkou ve ark, 2015). Ayrıca MLVA yöntemi abort materyalinden direkt tiplendirme yapmaya müsaittir (Laroucau ve ark, 2009). Bu yöntem bakteri genomundaki ardışık tekrar polimorfizmleri belirlemeye dayalıdır (Vergnaud ve Pourcel, 2006).

Türkiye’de genellikle etkenle ilgili serolojik çalışmalar yapılmış; koyunlarda ELISA ile Düzce’de %20.8 (Karagül ve ark, 2019) ve Burdur’da %32.0 (Öztürk ve ark, 2016) gibi nispeten yüksek seropozitiflik oranları bildirilmiştir. Yurdumuzda moleküler çalışmalar ve izolasyon çalışmaları ile etkenin varlığı ortaya konulmuş olmakla birlikte, bu çalışmalar ulusal anlamda hastalığın yaygınlığı ile ilgili yeterli veriyi sunmaktan uzaktır. Türkiye’de *C. abortus*’un izolasyonu ile ilgili ilk çalışma Türütöğlü ve Erganiş tarafından 1996 yılında gerçekleştirilmiş ve koyun abort materyalinden %16.6 oranında izolasyon yapıldığı bildirilmiştir. Daha sonra, Güler ve ark (2006) ve Kalender ve ark (2013) koyun abortlarından konvansiyonel PCR yöntemiyle sırasıyla %7.4 ve %9.8 pozitiflik elde etmişlerdir. Türkiye’nin sınır komşusu Yunanistan’da iki varyant suşu tespit edilmiştir (Siarkou ve ark, 2002). Ancak, Türkiye’de etkenin genotipleriyle ilgili herhangi bir veri bulunmamasıyla birlikte; Türkiye’de de coğrafi konumu gereği farklı tiplerde suşların bulunabileceği düşünülmektedir ve şimdiki bilgilerimize göre yurdumuzda seçicilik ve duyarlılığı en yüksek yöntemlerden biri olan Real Time PCR ile yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yönüyle çalışmamız hem bütün bir coğrafi bölgeyi kapsamaması, hem de Real Time PCR yöntemi ile yapılması sebebiyle ulusal anlamda bir ilktir. Bu çalışmada, Marmara Bölgesi’nde görülen ruminant abortlarında *C. abortus*’un Real Time PCR ile teşhisinin yapılarak MLVA ile genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece, hastalığın Marmara Bölgesi’nde görülen abort vakaları içerisindeki önemi belirlenerek, hayvan sağlığı ve halk sağlığı açısından daha iyi anlaşılmasına ve hastalıkla mücadele stratejisinin oluşturulmasına katkı sağlanacaktır. Ayrıca Marmara Bölgesi’nde mevcut olan etkenin genotiplerinin belirlenerek bu alanda Türkiye’deki ilk epidemiyolojik verinin elde edilemesinin, diğer coğrafik bölgelerde yapılacak benzer çalışmalara öncü olacağı ve dolayısıyla, ulusal olarak *C. abortus*’un genotipik çeşitliliğinin belirlenmesinin ilk adımı olacağı değerlendirilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Klamidya türleri kanatlılar, memeliler ve insanlarda çok farklı hastalıklara yol açan obligat intrasellüler bakterilerdir. Son zamanlarda kabul gören sınıflandırmaya göre, *Chlamydiaceae* familyası içerisinde *Chlamydia* tek cins olarak kabul edilmektedir. *Chlamydia abortus* ve *Chlamydia pecorum* türleri ruminantlarda hastalık oluşturan türlerdir. Sığırlarda klamidyalarm sebep olduğu enfeksiyonlar çoğunlukla reproduktif bozukluklar olup abort, endometritis, vaginitis gibi klinik belirtilere neden olmaktadır (Longbottom ve Coulter, 2003). Yavru atan hayvanlarda infeksiyöz elementer cisimcikler her türlü vücut salgıları ile (vajinal akıntılar, süt, dışkı, nasal ve oküler akıntılar) çevreye bulaşmaktadır. *C. abortus* infertiliteye ve embriyonik ölüme sebep olmakla birlikte semen ile de nakledildiği de bilinmektedir. Yabani hayvanlar da bu mikroorganizmanın rezervuarı olarak hastalığın yayılmasına sebep olurlar. Gebe olmayan hayvanlarda mikroorganizma gebeliğin başlangıcına kadar lenfoid dokularda latent formda bulunur. Bununla birlikte, abortus meydana gelinceye kadar enfeksiyon serolojik olarak ya da patojenin direk tespiti yoluyla saptanamamaktadır (Longbottom ve Coulter, 2003).

C. abortus laboratuvar ortamında oldukça zor (doku kültürü, embriyolu tavuk yumurtası, laboratuvar hayvanlarında) üretilebilmektedir. *C. abortus*'u üretebilmek için plasenta, fetal organlar, vaginal akıntı ve semen gibi biyolojik örnekler sıklıkla kullanılmaktadır. En çok kullanılan yöntemler embriyolu tavuk yumurtası, sürekli hücre kültürü, protein tespiti ve nükleik asit tespiti gibi tekniklerdir. En çok kullanılan serolojik yöntemler ELISA ve komplement fikzasyon testidir (CFT) (Longbottom ve Coulter, 2003). CFT uzun yıllar boyunca hastalık teşhisinde kullanılmış olsa da klamidyal antijenin büyük oranda tüm *Chlamydiaceae* için ortak olan LPS içermesi sebebiyle hatalı pozitifliklere sebep olmaktadır. ELISA yöntemleri ise tarama amaçlı kullanımda faydalı görülmektedir (WEB_2). Son zamanlarda etkenin abort materyalinden doğrudan teşhisini yapabilmesi, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi sebebiyle moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Bu yöntemlerden tür düzeyinde teşhis yapabilen, düşük tespit limitine sahip, validasyon çalışmaları yapılmış ve dünya hayvan sağlığı örgütü (OİE) tarafından önerilen yöntemlerden biri olan Real Time PCR yöntemi (Sachse ve ark, 2009) çalışmanın teşhis basamağında kullanılmıştır. Fenotipik ve moleküler araştırmalar *C. abortus*'un genetik heterojenitesinin düşük olduğunu göstermiştir. Ancak *C. abortus*, genomundaki ardışık tekrar polimorfizmlere

göre sınıflandırma yöntemi olan MLVA ile farklı genotiplere ayrılabilmiştir (Laroucau ve ark, 2009; Siarkou ve ark, 2015).

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

C. abortus, *Chlamydiaceae* ailesinin bir üyesidir. Bu ailede yer alan bakteriler, bir çok hayvan türünü ve insanı etkileyen çok çeşitli hastalıklara yol açar. Bunlardan bazıları abort, ensefalomyelit, pnömoni, konjuktivit, artrit, mastit, gastroenterit, solunum sistemi enfeksiyonları, trahoma, psittakoz, metrit ve cinsel yolla bulaşan hastalıklardır (Longbottom ve Coulter, 2003).

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 değerlendirerek etkene Chlamydozoa ismini vermişlerdir. Bu isimlendirmeyi Yunanca örtülü anlamına gelen Chlamys/khlamus'tan esinlenerek yapmışlardır. Daha sonra aynı etkeni uretrit, servisit, yeni doğan konjuktiviti, lenfograduloma venereum vakalarından tespit edilmiştir (Lindner, 1910; Durand ve ark, 1913). 1929-1930 yıllarında dünya çapında pandemiyle seyreden , psitasin kuşlarla temas halindeki insanlarda görülen akut ve atipik pnömoni vakalarında hem kuşlarda, hem insanlarda bulunan etkenin psitakoz etkeni de olduğu ortaya çıkmıştır (Bedson ve ark, 1930). Hastalık etkeni, bakteriyel filtrelerden geçebildiği ve besiyerinde üremediği için virüs olarak nitelendirilmiştir (Miyagawa ve ark, 1935). Rake ve Jones (1942) bir komplement fikzasyon antijeni identifiye etmişler ve bunun hastalığa neden olan etken olabileceğini bildirmiştir. 1966'da elektron mikroskopla etkenin yapısı incelendiğinde Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısının olduğu, DNA, RNA ve ribozom içerdiği görülmüş ve bakteri olarak sınıflandırılmıştır (Moulder, 1966). *Chlamydiae* ilk olarak embriyolu yumurtanın korioallontoik zarında kültüre edilmiştir. Daha sonra T'ang ve ark (1957) trahoma suşunu embriyolu tavuk yumurtasının sarı kesesinde kültüre etmişlerdir. O zamandan beri mikrobiyologlar etkenin daha derin morfolojik özelliklerini incelemek için bu yöntemi kullanmaktadırlar. Şu anda *Chlamydiaceae* bir çok monolayer hücre hattında üretilmektedir (Omsland ve ark, 2012). *Chlamydia trachomatis* için hücre içermeyen saf üretim çalışmaları da yapılmaktadır. (Nunes ve Gomes, 2014).

Önceleri *Chlamydiaceae* ailesinin sadece *Chlamydia* isminde tek bir cinsinin olduğu kabul edilirdi. Bu cinse ait 4 tür tanımlanırdı. Bunlar *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* ve *C. pecorum*'du (Borel, 2008). Daha sonra Everett ve Andersen (1999) 16S ve 23S rRNA sekans analizleri ile *Chlamydiaceae* ailesini, *Chlamydia* ve *Chlamydophila* olarak iki cins şeklinde tanımladılar (Everett, 2000). Bu tanımlamadan sonra yapılan çalışmalarda, sekans datalarının yetersiz olduğu ve tek cins olması gerektiği savunulmuştur (Schachter ve ark, 2001). Bunun üzerine 2009 yılında yine tek cins olarak sınıflandırılmıştır. 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. (Stephens ve ark, 2009).

C. trachomatis: İnsanlarda hastalık etkenidir. Nadiren koalalarda hastalık yapar. Çeşitli hastalıklara yol açan çok sayıda serovarı bulunmaktadır. Neden olduğu hasatlıklar; trahoma, pnömoni, artrit, yenidoğanlarda konjuktivit, lenfograduloma venereum, prostit ve diğer ürogenital yol enfeksiyonlarıdır.

C. suis: Önceden domuzların *C. trachomatis*'i olarak adlandırılırdı. Domuzlarda enterit, konjuktivit ve pnömoniye sebep olur.

C. muridarum: Farelerin *C. trachomatis*'i olarak adlandırılır. Fare, gine domuzu ve hamsterlarda solunum sistemi enfeksiyonuna yol açar.

C. psittaci: İnsan psittakozuna ve kanatlı klamidyozisine sebep olur.

C. abortus: Daha önce yapılan çalışmalarda *C. psittaci* serotip I olarak adlandırılırdı. Koyunlarda enzootik aborta, sığır, domuz ve keçilerde klamidyal aborta sebep olur.

C. caviae: Eski çalışmalarda *Chlamydia psittaci*'nin gine domuzu suşu olarak bilinirdi. Gine domuzlarında konjuktivite sebep olur.

C. felis: *Chlamydia psittaci*'nin kedi suşu olarak bilinirdi. Kedilerde konjuktivite ve pnömoniye sebep olur.

C. pneumoniae: İnsanlarda, sürüngenlerde, amfibilerde, koalalarda ve atlarda solunum sistemi enfeksiyonuna yol açar.

C. pecorum: Koyun, keçi, sığır ve domuzlarda pnömoni, enterit, artrit, poliartrit, konjuktivit, abort ve sporadik bovine ensefalitise sebep olur (WEB_1, 2017).

2014 yılında bu türlere 2 tane daha eklenerek tür sayısı 11'e çıkmıştır. *Chlamydia avium* güvercinlerde hastalığa sebep olurken, *Chlamydia gallinacea* tavuk, hindi ve beç tavuklarında enfeksiyona yol açtığı tespit edilmiştir (Sachse ve ark, 2014).

Ayrıca mısır turnasından izole edilen *Chlamydia ibidis* (Vorimore ve ark, 2013), şahinlerden izole edilen *Chlamydia buteonis* (Laroucau ve ark, 2019), yılanlardan tespit edilen

Chlamydia sanzinia, *Chlamydia serpentis* ve *Chlamydia poikilothermis* (Taylor-Brown ve ark, 2016; Staub ve ark, 2018) yeni aday türlerdir.

2.2. Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

C. abortus; Gram negatif, pleomorfik, hareketsiz, zorunlu hücre içi bir bakteridir. Etkenin kendisine özgü bir yaşam döngüsü vardır. Etken konakçı hücrelerinde retiküler cisimcik (RB) ve elementer cisimcik (EB) olmak üzere 2 farklı formda bulunur (Litwin, 1959). EB metabolik olarak inaktif, infeksiyöz ve çevresel etkenlere karşı dirençli, RB ise metabolik olarak aktif, çoğalan ancak infeksiyöz olmayan formudur. Elementer cisimcikler yaklaşık 0,3 µm boyutunda, küçük, oval şekillidir. Merkezi ve yoğunluğu yüksek bir çekirdek içerir. Sert hücre duvarıyla spor benzeri bir formdur. Çevresel şartlara çok dayanıklıdır. Retiküler cisimcik ise elementer cisimciğe göre daha büyüktür. Yaklaşık 1 µm boyutundadır. Yapısal olarak esnektir. RNA açısından daha zengindir ve yoğun DNA içerir. Yapısal özellikleri intraselüler çoğalma, nutrisyonel faktörleri alma, atıkları uzaklaştırma gibi metabolik aktiviteleri yapmasına olanak sağlar (Moulder, 1991).

Enfeksiyonu takiben 0.25 µm büyüklüğünde, küre biçimli ve hayli enfeksiyöz olan elementer cisimcikler giriş yoluna bağlı olmak üzere konakçının solunum, gastroenterik veya genital kanalındaki fagositik hücrelere veya mukoza epiteline lokalize olurlar. Daha sonra bakteri, 4 fazda konakçı hücreesindeki gelişimini tamamlar (Carter ve Wise, 2004).

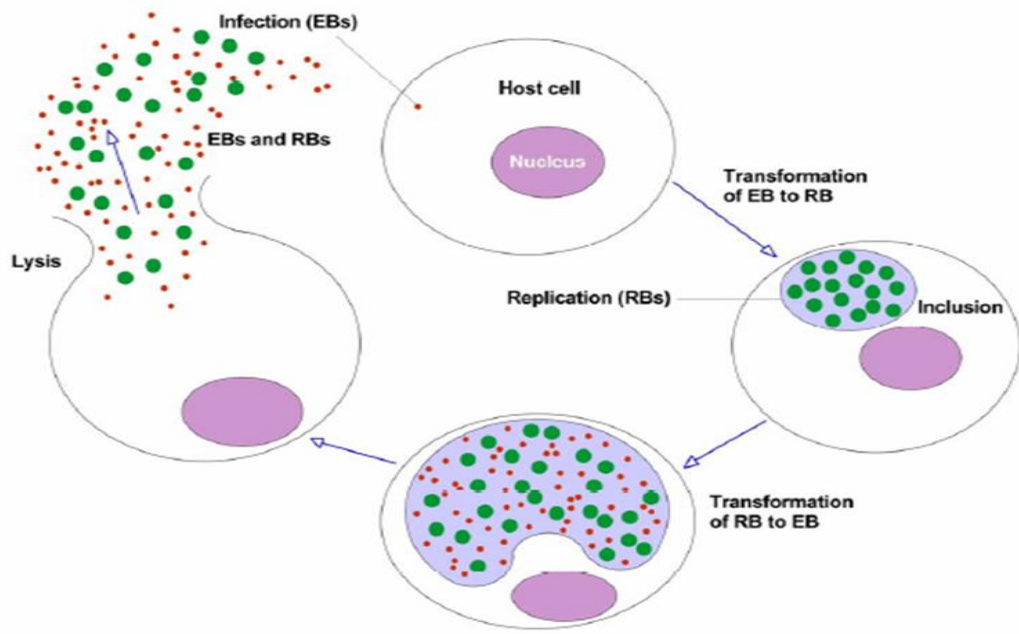
Faz 1: Uyuyan faz olarak bilinir. Bu fazda metabolik aktivite çok düşüktür. Elementer cisimciğin konakçı hücrelerce, özellikle trofoblast hücrelerince fagosite edilmeden önce hücreye bağlandığı fazı tarif eder.

Faz 2: Bu fazda elementer cisimcikler fagosite edilerek, inklüzyon denilen endozomal vakuoller oluşur. Bu inklüzyonlar lizozomlarla parçalanamaz. Metabolik aktivite 12 – 24 saat içerisinde başlar.

Faz 3: Metabolik aktivitenin başlamasında 24 – 48 saat sonra elementer cisimciğin çekirdeği dağılmaya başlar ve bu dağılma sonucunda retiküler cisimcik oluşur. Bu adımı retiküler cisimciklerin inklüzyon içerisinde ikiye bölünerek çoğalması izler.

Faz 4: Çoğalma tamamlandığında olgun retiküler cisimcikler son bölünmeden 20 – 30 saat sonra tekrar elementer cisimciklere dönüşürler. Daha sonra hücre lize olarak yüksek infektivitedeki elementer cisimcikler, yeni bir konakçıya tutunup yeni bir döngüyü başlatır (Moulder, 1991; Carter ve Wise, 2004).

Dördüncü fazı tamamlayan elementer cisimciklerin sayısı milyonları bulur ve bunlar uterus akıntıları, süt, idrar, dışkı yoluyla tekrar saçılırlar.



Şekil 1. *Chlamydia abortus*'un yaşam döngüsü (Samkange, 2008).

2.3. Antijenik Yapısı

2.3.1. Lipopolisakkarit (LPS)

Bakterinin antijenik yapısında yer alan lipopolisakkaritler ısıya dayanıklıdır. *Chlamydiaceae* ailesinin tüm üyelerinde ortak olarak bulunur. Hücre duvarının bileşenlerinden biridir. *Chlamydiaceae* için CFT ve ELISA gibi serolojik testlerde kullanılır (Everett, 2000).

2.3.2. Major Dış Membran Proteini (MOMP)

Patojen – konakçı etkileşiminde, bakterinin korunma mekanizmasında ve immunopatolojide önemli rol oynar (Lampe ve ark, 1993). LPS ile birleşerek kompleks

moleküler form oluşturur. Enfeksiyöz elementer cisimciklerin yüzeyindeki baskın antijenik yapıdır. MOMP, *ompA* genleri tarafından kodlanır. Bu genler VS1 - VS4 olarak adlandırılan farklı segmentler içerirler. Bu segmentler *C. abortus* ve *C. pecorum*'da farklıdır. Bu bölgelere spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak tür bazında tespit yapılabilir (Everett, 2000).

2.3.3. Polimorfik Dış Membran Proteinleri (POMP)

Bir tür MOMP olarak görülür. Özellikle *C. abortus* S26/3 suşunun hücre zarında olduğu düşünülmektedir. 4 tane gen tarafından kodlanır. POMP90 isimli 90 kda ağırlığındaki POMP'un *Chlamydia abortus*'un serolojik teşhisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (Longbottom ve ark, 1998).

2.3.4. Kazeince Zengin Dış Zarf Proteinleri

Sırasıyla *omp3* ve *omp2* genleriyle kodlanan A ve B zarflarıdır. RB olarak sentezlenip EB'ye dönüşürler. Her iki zarf da ozmotik stabiliteyi artıran kompleks yapı oluşumunu sağlarlar (Everett ve Hatch, 1995).

2.3.5. Isı Şok Proteinleri

Dış membran kompleksinde bulunan ısı şok proteinleri prokaryot ve ökaryot hücrelerde yaygın olarak bulunur ve yapısı oldukça iyi şekilde korunmuştur. Isı şoku yanıtı hücrelerin veya bakterilerin değişen çevresel koşullarda hayatta kalmasındaki en önemli mekanizmalardan biridir. Isı şoku yanıtı stres koşulları altında transkripsiyonu tetikleyerek bakterilerin kısa süreler içerisinde yeni proteinler sentezlemesini sağlar. Klamidya kültürleri 42-45 °C ısıda tutulduklarında birkaç dakika içerisinde transkripsiyon seviyesinde düzenlenmiş ısı şok yanıtı geliştirmektedir. *Escherichia coli* *groEL*'in ve *dnaK* genlerinin ilgili homologları olduğu tespit edilen genler, 10, 60 ve 70 kD olan ısı şok preoteinlerini klonlar ve dize. Bu klamidyal genler, klamidyal yaşam döngüsü boyunca temel olarak eksprese edilir. Isı stresi sırasındaki regülasyonlarda da novo protein sentezi gerektirir. Klamidya'daki *groEL* ve *groES* genleri, polistronik haberci RNA transkriptlerine sahip bir

kalıtım bölgesi oluşturur. Klamidya genom dizilemesinden elde edilen veriler hepsinin bakterinin tüm yaşam döngüsü sırasında işlevsel olup olmadığı belli olmayan üç *groEL* kopyası olduğunu göstermiştir. *dnaK* geninin ekspresyonu, ısı şokuna maruz kaldıktan sonraki 10 dakika içinde en az 10 kat artar ve oluşan transkriptler yaklaşık 5 dakikalık yarı ömüre sahiptir. Her üç ısı şok proteinleri temel dış membran kompleksinde ve kısımlarında yer alır. Ayrıca bu ısı şok proteinleri Klamidya türlerinde çok iyi korunmuştur. Protein düzeyinde benzerlikleri % 95 'den fazladır. Klamidyanın immünobiyolojisi için önemli olan bu ısı şok proteinlerinin, diğer bakteri türleriyle amino asit açısından % 60 ve insan ısı şok proteinleri ile yaklaşık % 50 homolojiyi paylaşır. *DnaK* (hsp70) protein ailesi, hücre içi taşınmada polipeptitlerin bağlanması, katlanması ve translokasyonunda yer almaktadır. Hsp60' ın klamidya içindeki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak *Escherichia coli*'nin yüzeyinde eksprese edilen rekombinant hsp70'in, bakterilerin insan endometrial epitel hücrelerine bağlanmasına neden olduğu ve bu nedenle bir ligand fonksiyonuna sahip olduğu gösterilmiştir. Bu proteine karşı oluşan antikor klamidya enfektivitesini in vitro olarak nötralize eder. *GroEL* ve *GroES* (hsp10 ve hsp60) protein ailelerinin, yeni sentezlenmiş oligomerik peptitlere refaket ettiği ayrıca katlanma ve translokasyonda rolleri olduğu bildirilmiştir. Klamidyal hsp 60 bakterinin tüm yaşam döngüsü boyunca görülür. Isı şok proteinlerinin hücre içi transport mekanizmalarında, büyük moleküllerin oluşturulması ve ayrıştırılmasında ve anormal veya fonksiyonunu kaybetmiş moleküllerin parçalanmasında rol aldığı da düşünülmektedir. Hücrel immun aktivasyona yanıt olarak, protein katlanması ve degradasyonunda rol alırlar (Raulston, 1995; Peeling ve Mabey, 1999; Lund, 2001).

2.3.6. Glikolipid Antijenleri

Klamidyalar cins spesifik glikolipid antijeni sentezlerler. Bu antijenler enfeksiyon sonrası hücre kültürlerinde 48 – 72 saat sonra ve embriyolu tavuk yumurtalarında Elementer cisimciklerde tespit edilmişlerdir. Lipopolisakkaritin iç yapısında bulunur (Stuart ve ark, 1994).

2.4. Epidemiyolojisi

2.4.1. Konakçı Dağılımı

C. abortus esas olarak koyun ve keçilerin hastalığıdır. Bununla beraber, daha az sıklıkla sığırlarda, mandalarda, domuzlarda, atlarda, geyiklerde, lamalarda ve insanlarda enfeksiyona yol açar (Wang ve ark, 2001; Borel, 2008). Etken ayrıca Gine domuzu, tavşan, fare, yeşil deniz kaplumbağası, yılanlar ve kurbağadan izole edilmiş olsa da, hastalıkla direkt ilişkisi henüz ispatlanmış değildir (WEB_1, 2017). Çin’de kürkü için yetiştirilen tilki, rakun ve vizonlarda etken tespiti yapılmış ve bu hayvanların taşıyıcı olduğu ve halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği değerlendirilmiştir (Li ve ark, 2018).

2.4.2. Etkenin Dayanıklığı

Elementer cisimcikler çevrede, ılıman mevsimlerde günlerce, donma ısısına yakın ısılarda ise aylarca canlı ve enfeksiyöz olarak kalabilir (Borel, 2008). Elementer cisimcikler toprak ve dışkıda ise uzun süreler canlı kalır (Carter ve Wise, 2003).

Diğer bir çok bakteri gibi otoklavda 121⁰C’de 15 dakikada, 160⁰C – 170⁰C kuru sıcakta 1 saatte ölür. Bir çalışmada *Chlamydia trachomatis*’in %0.25- 2.5 sodyum hipoklorit, %70 etanol, %2 glutaraldehit, ortofitalaldehit, %7.5 hidrojen peroksit ve %0.2 perasetik asite duyarlı olduğu bulunmuştur. Kuaterner amonyum bileşiklerinin etkili olduğu düşünülmektedir. *C. pcittaci*’nin asit ve alkali dezenfektanlara dirençli olduğu raporlanmıştır (Smith ve ark, 2005; Coulon ve ark, 2012).

2.4.3. Hastalığın Dünyadaki Durumu

Hastalık ilk kez Almanya’da raporlanmıştır. Hastalık etkeni dünyada aborta neden olan ana etkenlerden biri olarak kabul edilir; yapılan sıralamada aborta sebep olan etkenler arasında ikinci sıradadır. Birinci sırada olan Bruselloz ise etkin mücadeleyle bir çok ülkede kontrol altına alınmıştır (Rodolakis, 2001). Yeni Zelenda ve Avustralya hastalıktan aridir. Kuzey Avrupa’da en önemli enfeksiyöz abort etkenidir. Birleşik Krallık’ta 1995-2008 yılları arasında görülen ve teşhisi yapılan enfeksiyöz abort etkenleri arasında *C. abortus*’un oranı

%44 olarak bulunmuştur (Stuen ve Longbottom, 2011). İspanya’da ise küçük ruminant abortlarında *C. abortus*’un oranı %56’ya kadar çıkmaktadır. Borel ve ark (2004) İsviçre’de *C. abortus*’un seroprevalansını %19 olarak belirlemişlerdir. Tunus yine Klamidyal abortların yüksek olarak görüldüğü bir ülkedir. Tunus’ta *C. abortus* kaynaklı abort oranı %58 seviyesinde bulunmuştur (Rekiki ve ark, 2002). Enfeksiyonun yüksek oranda görüldüğü ülkelerden bir diğeri Ürdün’dür. Al-Qudah ve ark (2004) yaptıkları bir çalışmada, abortların görüldüğü aşılanmamış 56 sürüyü komplement fikzasyon testi (CFT) ile kontrol etmişler ve sürülerin tamamının *C. abortus* yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Amerika Birleşik Devletleri’nde ilk doğumunda abort yapan keçilerden en çok izole edilen etkindir (Aiello ve Mays, 1998). Hastalığın Meksika’daki varlığı serolojik ve moleküler olarak gösterilmiştir (Campos-Hernández ve ark, 2014). Çin’de yapılan çalışmada keçilerde seroprevalans %8.5 olarak tespit edilmiştir (Hu ve ark, 2018). Yunanistan’ın güneyinde yapılan serolojik çalışmada *C. abortus*’a karşı antikor yanıtları koyunlarda %14.9, keçilerde %21.2 oranında pozitif olarak bulunmuştur (Bisias ve ark, 2010).

2.4.4. Hastalığın Türkiye’deki Durumu

Türkiye’de ilk olarak Ataman ve Hakioglu (1955), Eskişehir’in Beylikahır ilçesi ve civar köylerindeki koyunlarda hastalığı teşhis etmişlerdir. Yılmaz (1962) Bandırma Merinos Çiftliği ile Tahirova Türk-Alman Çiftliği’ndeki yavru atan koyunlarda enzootik abortusu serolojik olarak saptamıştır.

Etkenin seroprevalansı bölgelere göre farklılık gösterir. Gökçe ve ark (2007) Kars’ta yaptıkları bir çalışmada, abort görülen koyunlarda seropozitiflik oranını %13.9, sığırlarda ise %8.33 olarak bulmuşlardır. Yine Kars’ta Otlı ve ark (2007) abort yapan koyun serumlarında %5.4 seropozitiflik belirlemişlerdir. Çaya ve ark (2006) *C. abortus* seropozitiflik oranlarını Kahramanmaraş’ta %30, Hatay’da %27, Mersin’de %23.5, Kilis’te %20, Gaziantep’te %16.8, Şanlıurfa’da %16.7, Osmaniye’de %9.5, Adıyaman’da %5, Adana’da %2.5 olarak tespit etmişlerdir. Küçükayan ve ark (2007) 2003 – 2007 yılları arasında Etlik Merkez Veteriner Kontrol Enstitüsüne gönderilen atık fetüs ve kan serumlarından yaptıkları çalışmada koyun kan serumlarından 2635’inden 395’inde (%15) Bruselloz’a 1746’sının 130’unda (%7.4) Kampilobakterioz’a, 1296’sının 3’ünde (%0.23) Salmonelloz’a, ve 2376’sının 43’ünde (% 1.8) ise Klamidyoz’a karşı antikor saptamışlardır. Duman ve Durak (1998) Konya bölgesinde görülen atıklardan CFT ile %20 seropozitiflik ve %12.5 şüpheli sonuç tespit

etmişlerdir. Türütoğlu ve Erganiş (1996) 80 koyun abort örneğinin 13'ünden (%16.3) etkeni izole etmişlerdir. Güler ve ark (2006) 94 adet koyuna ait vaginal sıvı örneklerinin 7'sinde (% 7.5) Klamidyal DNA tespit etmişlerdir. Kalender ve ark (2013) Kuzey Anadolu'da görülen abortlardan temin edilen 64 koyun abort materyalinde, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile %9.8 oranında etken DNA' sını belirlemişlerdir. Kılıç ve ark, (2010) Elazığ yöresinde sığırlara ait 47 abort materyalinden hem kültürel olarak hem de PCR ile 3 pozitiflik bulmuşlardır. Öztürk ve ark (2016) ELISA yöntemini kullanarak Burdur' da koyunlarda hastalığın seroprevalansının %32 olduğunu bildirmişlerdir. Düzce'de 72 koyun kan serumu örneğiyle yapılan serolojik çalışmada *C. abortus* seroprevalansı %20.8 olarak bulunurken, seropozitif sürülerin oranı % 42.8 olarak belirlenmiştir (Karagül ve ark, 2019).

2.4.5. Enfeksiyon ve Bulaşma

Yavrulama esnasında kontamine olan çevre, kuzu ve oğlaklar için enfeksiyonun en büyük sebebini oluşturmaktadır. Abort esnasında saçılan *C. abortus*'un elementer cisimcikleri enfeksiyonun ana kaynağıdır. Üst solunum yolları, göz ve ağız mukozası ana giriş yolları olarak görülmektedir. Gebe ve gebe olmayan koyunlarla yapılan çalışmalarda, enfeksiyondan sonra bakterinin kan yolu ile tüm vücuda dağıldığı gösterilmiştir. Etkenin plasenta ve uterusu tespit edilebildiği geç gebelik dönemine kadar, dışkı saçılımı haricinde enfeksiyon görünmez kalır (Dawson, 1988).

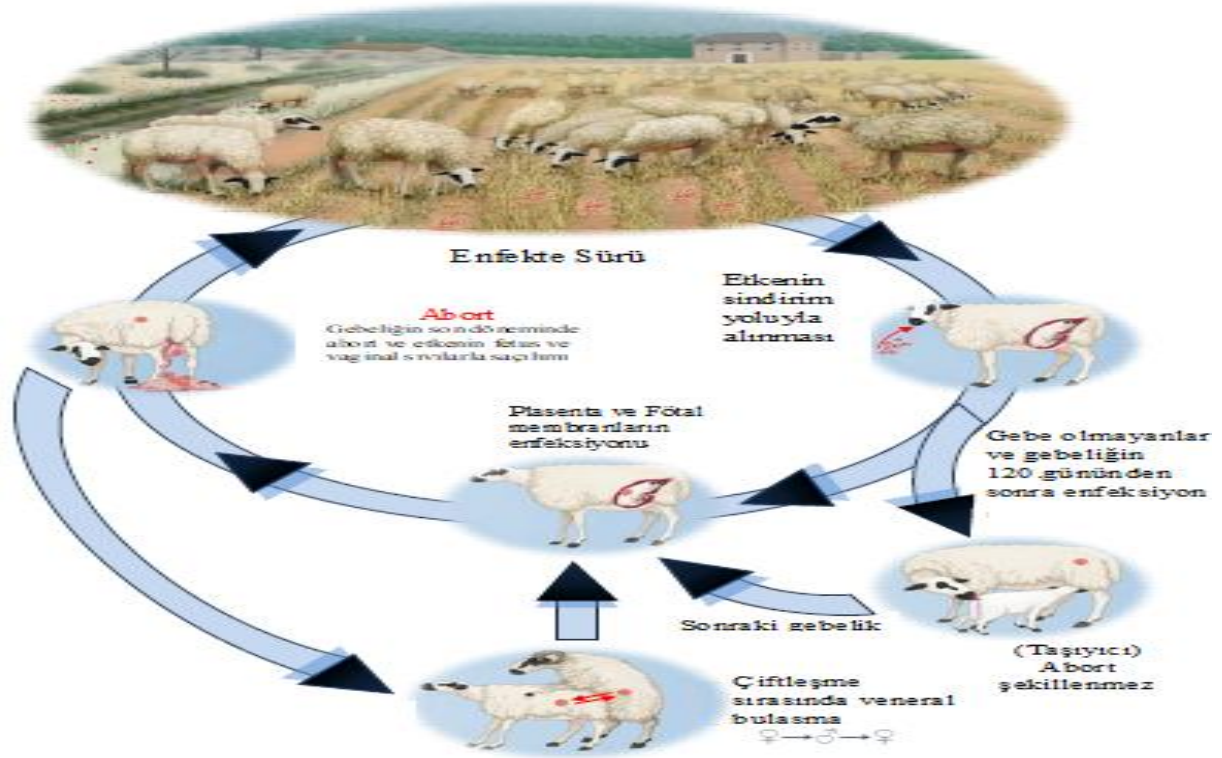
Enfekte anneler, yavrulama sırasında plasenta ve fötal sıvılar ile birlikte yüksek miktarda elementer cisimcik yayarlar. Enfeksiyondan aborta kadar geçen süre koyunlarda 6 haftaya ve keçilerde 2 haftaya kadar düşebilir (Dawson, 1988). Koyunlarda etkenin saçılımı aborttan bir gün önce vaginal akıntılarla başlar ve 2-3 hafta devam eder. Ovulasyondan 2-3 gün öncesi ve sonrasında da etken saçılımı olmaktadır (WEB_1, 2017). Keçiler koyunlardan farklı olarak aborttan 2 hafta öncesinden 2 hafta sonrasına kadar elementer cisimcikleri yayabilirler (Dawson, 1988; Rodolakis, 2001). Bazı hayvanlarda vaginal akıntılarla etkenin saçılımı 2-3 yıl sürebilir (WEB_1, 2017). İnkubasyon süresinin daha kısa olması ve vaginal sekresyonların erken başlaması, salgının başlangıcında fazla sayıda hayvanın etkilenmesine sebep olabilmektedir (Dawson, 1988). Keçilerin fizyolojik durumuna göre enfeksiyona duyarlılıkları değişmektedir. Gebeliği 100. günden az olanlar, gebeliğin geç döneminde olanlara ve gebe olmayanlara göre enfeksiyona daha duyarlıdır. Abort sonrasında süt, idrar ve dışkıyla düşük miktarlarda etken uzun süre saçılabilir (Rodolakis, 2001).

Enfeksiyon, anneden yavruya iki şekilde geçer; birincisi enfeksiyonun doğum esnasında doğum kanalından bulaşması ile olur. Bu durumda enfekte yavru ikinci gebeliğinde yavru atar (Pelzer, 2012). Diğer yol enfeksiyonun uterusu kongenital yolla yavruya geçmesidir. Bu durumda enfekte yavru ilk gebeliğinde abort yapar (Aiello ve Mays, 2005). Abort görülmediği durumlarda ise yavru, persiste enfekte olarak etkeni sürü içerisinde veya sürüler arasında saçmaya devam eder (Rodolakis, 2001; Kadra ve Balla, 2006).

Teankum ve ark, (2007) koç ve boğaların genital organları ve semenlerinde *C. abortus*' un varlığını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda tüm genital organları etken yönünden negatif bulunurken, 304 boğa semeninin 20 tanesinde etkeni PCR ile teşhis etmişlerdir. İncelenen tüm koç semenleri ise etken yönünden negatif bulunmuştur.

Etken, sığırların testis ve epididimisinden izole edilmiştir. Ayrıca etkenin suni tohumlama için hazırlanmış ve dondurulmuş semende canlı kalabildiği gösterilmiştir. (Storz ve ark, 1966). Etken koçlar için de epididimitis etkenidir (Lozano, 1986).

Enfeksiyon kaynakları ve bulaşma yolları aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Enfeksiyon ve bulaşma yolları (Manasrah, 2013).

- *C. abortus*, abort yapmış annenin dışkısında, idrarında, uterus akıntısında ve daha az olmakla birlikte sütünde bulunur. Asemptomatik hayvanlar kronik taşıyıcı olabilir (WEB_1, 2017).

- Abort materyali, dışkı, uterus sıvıları gibi etkenin bulunduğu sekret ve ekstrekter ile kontamine yem veya suyun sindirim yoluyla alınmasıyla (Aiello ve Mays, 2005)
- Kontamine toz, aerosol ve damlacıkların inhalasyonu (Carter ve Wise, 2003)
- Çiftleşme sırasında venereal veya mekanik olarak (Livingstone ve ark, 2009)
- Anneden yavruya vertikal yolla (Aitken, 2007) ve
- Karga, tilki gibi vahşi vektörlerin etkeni sürüler arasında taşınmasıyla bulaşır (Dawson, 1988).

2.5. Patogenez

İnkubasyon periyodları farklı olmakla birlikte abort genellikle enfeksiyondan 5 – 6 hafta sonra gerçekleşir. Koyun ve keçiler *C. abortus* ile gebelik öncesi ve sonrası enfekte olabilirler. Enfeksiyonun zamanı, abortun hangi gebelik döneminde olacağı ile ilgili önem arz etmektedir. Eğer hayvan gebeliğin 30 – 120. günlerindeyse hayvan abort yapar. Eğer enfeksiyon gebelik öncesi veya gebeliğin 120. gününden sonra oluşmuşsa bir sonraki gebeliğinde abort görülür (Aitken, 2007).

C. abortus konakçıda hematogenesis yoluyla yayılır (Givens ve Maraly, 2008). Etken plasentada, özellikle de fetal korionik epitelyumun trofoblast hücrelerinde lokalize olmayı tercih eder. Daha sonra çevredeki interkötiledonar membranlara yayılır ve karakteristik nekrotik plasentite sebep olur (Buxton ve ark, 2002).

Etken elementer cisimciklerin çoğalmasıyla en erken gebeliğin 90 – 95. günlerinde plasental dokulardan PCR ile tespit edilebilir (Buxton ve ark, 1990). Enfeksiyon latent hale de geçebilir. Ancak stres veya başka enfeksiyonlar sebebiyle immun sistem zayıfladığında tekrar aktive olur. Antijenik uyarımın yüksek olması interlökin 1 tarafından oluşturulan ve LPS tarafından uyarılan kronik inflamasyon ve skarizasyon ile sonuçlanır (Carter ve Wise, 2003).

C. abortus'un patogenezinde rol alan 3 ana virülens faktörü bulunmaktadır.

Cins spesifik lipopolisakkarit antijen veya komplement fikzasyon antijeni konakçı savunma hücrelerinden saklanmanın yanısıra inflamasyonu da uyarmaktadır.

Proteaz / proteozom benzeri aktivite faktörü (CPAF), konakçının major histokompatibilite kompleks (MHC) üretimi ile ilgili transkripsiyon faktörlerini azaltarak etkenin T hücrelerince tanınmasını engeller ve MHC tarafından oluşturulan immun sistem hücreleri arasındaki ilişkiyi bozar.

Tip 3 sekresyon aparatı, vakuol membranında bir kanal açarak patojenik ürünlerin konakçı hücre sitozolüne bırakılmasını sağlar. Örnek olarak CPAF bu yöntemle transfer edilir (Aitken, 2007).

2.6. Klinik Belirtiler

C. abortus ruminantlarda poliartrit, konjunktivit, pnömoni ve abortu içeren çeşitli klinik belirtilere neden olur (WEB_2, 2018).

Aşağıda sayılan faktörler varsa Klamidyal enfeksiyondan şüphelenilebilir.

- Sürüdeki hayvanlar ağır stres koşullarında yaşıyorlarsa (Transport, sıcak vb)
- Sürü geçmişinde *C. abortus* veya diğer abort etkenleri kaynaklı abort vakaları varsa
- Sürü çeşitli kaynaklardan yeni toplanmışsa.
- Damızlık erkekler başka sürülerce de kullanılıyorsa
- Yem ve su hijyeni iyi değilse
- Hayvan etleri veya aborte fetus ile beslenen evcil hayvanlar bulunuyorsa
- Suni tohumlamada kontamine materyal kullanılıyorsa
- Sürü ortak merada başka sürülerle birlikte otluyorsa
- Abortlar gebeliğin 3. Trimesterinde şekilleniyorsa
- Doğan kuzular 24 saat içerisinde ölüyorsa
- Çevre çiftliklerde de abortlar görülüyorsa
- Sürüye dışarıdan yeni dişi hayvan alınmışsa
- Sürüye oranla yüksek abort oranları görülüyorsa
- Daha önce sürüye *C. abortus*'un canlı aşısı yapılmışsa.

Hastalık gebeliğin son aylarında görülen abort ile karakterizedir. Prematüre doğumlar, yaşama gücünden yoksun yavru doğumları ve düşük canlı ağırlıkta yavru doğumları da görülebilir. Abort önceden hiçbir belirti vermeksizin görülebilir. Abort oranı %25-90 arasında değişebilir. Abort yapan dişilerde daha sonra metrit veya solunum sistemi enfeksiyonu görülebilir (Aitken, 2007). Aborttan sonra hızlıca iyileşme gözlenebilir. Bazı keçilerde kahverengi vaginal akıntı görülebilir. Dispne belirtileri görülmeksizin devam eden süregelen öksürük, artrit ve keratokonjunktivitis gelişen diğer komplikasyonlardır (Rodolakis, 2001).

C. abortus enfeksiyonlarında en yüksek abort insidensi enfeksiyon sürüye girdikten sonraki 2. yavrulama sezonunda ortaya çıkar (Kadra ve Balla, 2006). Enfeksiyonun yeni

girdiği bir sürüde ilkine gebelerin %90'ı hastalıktan etkilenebilir. Süt üretiminde azalma görülür. Yüksek abort oranı hastalık siklik döngüye girene kadar 3 yıl süreyle devam eder. Daha sonraları her sene yeni eklenen dişilerle abort oranı %10' lar seviyesinde sabit kalır. Hayvanlar genellikle hızlıca iyileşir ve genellikle daha sonraki gebelikler sorunsuzdur. İki kez aborta nadir olarak rastlanmaktadır (Rodalakis 2001, Kadra ve Balla, 2006).

Aborte fetüslerin üzerinde kırmızı-kahverengi bir akıntı bulunabilir. Renksiz veya kırmızı renkli difüz ödem, retensiyon sekundinarum, abdominal ve pleural boşluklarda kanlı sıvı birikimi, dil ve ağız boşluğunda peteşiyel kanamalar görülen diğer değişikliklerdir (Rodolakis, 2001).

2.7. Aşılar ve Bağışıklık

C. abortus enfeksiyonlarında immunité Immunglobulin G (IgG) ve Immunglobulin M (IgM) ile ilişkilidir. Enfekte hayvanın dolaşımında bu immunglobulinlerden birinin veya ikisinin birlikte bulunması enfeksiyonun zamanı hakkında bilgi verir. Antijene karşı verilen ilk yanıt IgM' dir. IgM, antijenin tanınması ve dolayısıyla daha uzun ve güçlü immun yanıt oluşturulmasında rol alır. Eğer IgM seviyesi yüksekse enfeksiyon yeni başlamış olarak kabul edilir. Eğer neonatal dönemdeyse intrauterin enfeksiyon varlığını gösterir. IgG yanıtı IgM yanıtından daha sonra gelişir ve uzun sürelidir. Bağışıklığın temeli IgG'dir. Ayrıca hastalığın evresi hakkında bilgi verir ve serolojik testlerde IgG spesifitesi daha yüksek olduğu için tercih edilir (Manasrah, 2013).

Klamidyozu karşı immunité hastalığı geçirerek ve aşılama yolu ile oluşur. Hastalığı geçiren hayvanlarda bağışıklık yıllarca sürer. Keçilerde bu süre 3 yıl kadardır. Ancak bu hayvanlar asemptomatik taşıyıcılarıdır ve enfeksiyonu yaymaya devam ederler (WEB_1, 2017).

Aşılama en çok canlı ve inaktif aşılar kullanılmaktadır. İnaktif aşılar genellikle embriyolu tavuk yumurtasında veya hücre kültürlerinde üretilmiş bütün halde elementer cisimcikleri içeren adjuvanlı aşılarıdır. Hastalığı kontrol altına almada etkili olmalarına rağmen tam bir koruma sağlamazlar. Rodalakis ve Soirau (1983) inaktif bir aşının %50 oranında abort miktarını azalttığını ancak vajinal saçılıma etkisi olmadığını ortaya koymuşlardır. Garcia ve ark (2004) ticari 2 inaktif aşıyı deneysel 2 aşıyla karşılaştırmış ve özellikle deneysel M7 aşısının diğerlerine göre keçileri aborttan korumada ve bakteri saçılımını azaltmada etkili olduğunu belirtmiştir. Atenüe aşılar ise enjeksiyon bölgesinde

lokal yangısal reaksiyonlara yol açmasının yanında uygulayıcının enjektörü kendine batırması açısından risklidir (Aitken, 2007). Canlı aşılarda ısıya duyarlı mutant *C. abortus* 1B suşu kullanılmaktadır. Bu suş patojenik saha suşu olan AB7 nin nitrosoguanidin ile indüklenmiş ısıya duyarlı mutantıdır. 38⁰ C' de ürerken, koyunların vücut ısısı olan 39.5⁰C' de üremesi sınırlıdır (Rodolakis ve Souriau, 1983). Çiftleşmeden 4 hafta önce uygulanır ve güçlü ve uzun süreli bir immun yanıt oluşturur ve doğum esnasında bakteri saçılımını azaltır. Hem canlı hem inaktif aşılar çiftleşmeden 4 hafta önce uygulanabilir. İnaktif aşılar gebelik döneminde de uygulanabilir, canlı aşılar da gebelik döneminde uygulanabilse de çiftleşme sonrası en az 4 hafta beklenmelidir. Aşılama 3 yıl sonra veya gerekli görülürse daha önce tekrarlanır (Aitken, 2007). Canlı *C. abortus* aşılarının başka abort etkenlerini içeren aşılarla kombine edilerek kullanımına yönelik çalışmalar vardır. Canlı *Brucella melitensis*, *Salmonella Abortusovis* ve *C. abortus* 1B aşılarının birlikte uygulanması fare modeli üzerinde denenmiş ve oluşan bağışıklığın aşının tek uygulanmasına göre farklı olmadığı belirtilmiştir (Plommet ve ark, 1987). Benzer bir çalışmada aynı aşılar bu kez hedef hayvan olan koyunlar üzerinde denendiğinde yine benzer sonuçlar elde edilmiştir (Souriau ve ark, 1988). *C. abortus* 1B canlı aşısının canlı toxoplasma aşısı ile aynı zamanda farklı enjeksiyon yerlerinden uygulanabileceği ortaya konulmuştur (Chalmers ve 1997).

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan aşılar ısı ile atenüe edilmiş *C. abortus* 1B suşunu içeren canlı aşılardır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar canlı aşılarla ilgili bazı soru işaretlerini ortaya çıkarmıştır. Sargison ve ark (2015) hastalığın daha önce görülmediği ve düzenli olarak canlı *C. abortus* 1B aşısının uygulandığı bir çiftlikte 2012 yılında meydana gelen abort vakalarını incelemişlerdir. Bu vakalarda *C. abortus* kaynaklı abortlarda olduğu gibi plasentada multifokal kalınlaşmalar, grimsi beyaz akıntılar bulunmaktadır. Mikroskopik boyamalarda aside dirençli hücre içi inklüzyon cisimcikleri görülmüştür. Immunohistokimyasal boyamalarda klamidya spesifik lipopolisakkaritler belirlenmiştir. Abort materyalleri moleküler yöntemlerle incelendiğinde *C. abortus* DNA'sı tespit edilmiş ve restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizleriyle bu DNA'nın *C. abortus* 1B aşısına ait olduğu anlaşılmıştır. Daha sonrasında sürüden toplanan kan serumları CFT ile incelendiğinde sadece hastalık durumlarında oluşabilecek kadar yüksek titrelerle karşılaşılmıştır. Tüm bu bulgular aşı suşunun hastalığa neden olduğunu düşündürmektedir.

Virüent saha suşları ve aşı güvenlik çalışmaları sırasında meydana gelen abortlardan izole edilen suşların, tüm genomlarının incelenmesi sonucu aşı suşu 1B'nin atenüe olmamış olabileceği, bağışıklığın çok yüksek dozlarda elementer cisimciklerin koruyucu bağışıklığı uyarmasıyla oluşmuş olabileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca daha önce aşı uygulanmamış ve

abört yapmış bir hayvandan da aşu suşu 1B'nin tespit edilmesi, aşu suşunun hayvandan hayvana bulaşıp hastalık oluşturabileceğini göstermektedir (Longbottom ve ark, 2018).

Deneysel koşullarda subünit aşular başarılı sonuçlar vermesinin yanında hazırlaması zor ve pahalıdır. Rekombinant protein ve DNA aşuları ise şu ana kadar çok etkili sonuç vermemiştir (Aitken, 2007).

2.8. Zoonotik Önemi

C. abortus zoonotik bir bakteridir. Gebe kadınlarda hayati tehlikeye kadar varan ciddi enfeksiyona ve aborta yol açar (Jorgensen, 1997). Enfeksiyon özellikle yavrulama mevsimindeki enfekte hayvanla temas edilmesi ve abort materyaliyle kontamine gıdaların sindirim yoluyla alınmasıyla şekillenir. Etkenin inhalasyon yoluyla alınması ciddi pnömoniye yol açabilir (Ward, 2006).

Pastörize edilmemiş süt de insanlar için bir risk faktörü olarak değerlendirilir (Dawson 1988). Mezbaha çalışanları, hayvan bakıcıları, aşu üretiminde çalışanlar ve laboratuvar çalışanlarında hastalık bildirilmiştir (Ward, 2006).

Kadınlarda *C. abortus* şüpheli spontane abortların geçmişi 1950'lere kadar dayanmaktadır. Ancak bu konuda ilk dökümantasyon 1967 yılına aittir. 1987-2000 yılları arasında ise *C. abortus* etkeni tespit edilmiş 20 insan abort vakası bulunmaktadır. (Pospischil ve ark, 2002).

Fransa'da hamile bir kadında gebeliğinin 23. haftasında kuru öksürük, yüksek ateş, baş ağrısı gibi grip benzeri belirtiler gösteren akut solunum yolu hastalığı ile birlikte düşük gerçekleşmiştir (Pichon ve ark, 2020). Benzer olarak İtalya'da hayvan abort materyalleriyle temas geçmişi olan 32 haftalık hamile bir kadında septisemiye takiben çoklu organ yetmezliği görülmüş ardından abort gerçekleşmiştir (Walder ve ark, 2005). Her iki vakada da hastalık anne için çok ciddi seyretmiş ve antibiyotik tedavisi ile iyileşme sağlanmıştır.

Kadınlar gebeliğinin her döneminde enfeksiyona duyarlıdır. Abort gebeliğinin 14-32. haftaları arasında oluşur. Tedavi edilmeyen vakalarda aborta ek olarak septisemi, yorgunluk, ateş, pelvik enflamasyon, pnömoni, böbrek yetmezliği, hepatit, ve yaygın damar içi koagülasyon ile birlikte trombositopeni görülür.

Diğer insanlar için hastalık non-spesifik semptomlarla seyreder. Bu semptomlar baş ağrısı, baş dönmesi, ateş, kusma gibi grip benzeri semptomlardır. İnsandan insana bulaşma bilinmemektedir.

Gebe kadınlar şüpheli hayvanlarla, özellikle de abort yapmış hayvanlarla yakın temasta bulunmamalıdır. Hayvanlara temas gerekliyse koruyucu önlemler alınmalı, hijyene dikkat edilmeli ve dezenfeksiyon tedbirleri alınmalıdır (Kadra ve Balla, 2006; WEB_1, 2017).

Laboratuvar çalışanları da risk altındadır. Etkenle çalışılırken en az Biyogüvenlik düzeyi II laboratuvara ihtiyaç vardır (WEB_2, 2018).

2.9. Teşhis

C. abortus'un teşhisi etkenin izolasyon ve identifikasyonuna, etkenin kendisinin veya nükleik asidinin tespit edilmesine dayanır. Abort sırası ve sonrasında humoral immun yanıt tespit edilebilir. Teşhis için koyun ve keçilerde gebeliğin son döneminde abort hikayesi, nekrotik plasentit ve etkenin yoğun olarak bulunduğu plasenta bölümlerinden yapılan boyamalarda etkenin görülmesi çok önemlidir. Yeni doğanın üzerinden annesi tarafından temizlenmeden alınan sıvaplar, abort yapan anneden alınan vaginal sıvaplar teşhis amaçlı kullanılır. Kotiledonlardaki lezyonlar *Toxoplasma gondii* ile benzerlik gösterir. Boyamalar ise *Coxiella burnetii* ile karışabileceği için dikkatli olunmalıdır.

Klamidyal antijen ELISA, immunhistokimya ve floresan antikor testi ile tespit edilir. Etkenin DNA'sı PCR veya mikroarray ile saptanır. Bunlardan bazıları ticari kit olarak bulunmaktadır.

Etkenin izolasyonu için canlı hücreye ihtiyaç vardır. Bu amaçla embriyolu tavuk yumurtası ve çeşitli hücre kültürleri kullanılır (WEB_2, 2018).

Teşhiste kültür altın standart olsa da, klinik örneğin taşınmasında özel besiyerlerine ihtiyaç duyulması, kontaminasyon nedeniyle izolasyon yapılamaması ve izolasyon şansının az olması gibi dezavantajları vardır. Moleküler yöntemler ise diğer yöntemlere göre çok daha duyarlıdır (Ward, 2006).

2.9.1. Serolojik Testler

Erken doğum veya abort sonrası antikor yükselişi CFT ile tespit edilebilse de bu durum her koşulda geçerli değildir. CFT'nin duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür. *C. pecorum*'da da bulunan lipopolisakkarit antijeni kullanılır. *C. pecorum* çoğu ruminantın bağırsaklarında

bulunur. Bu iki tür arasındaki ve bazı diğer Gram negatif bakterilerle oluşan çapraz reaksiyonlar sonuçların yanıltıcı çıkmasına sebep olabilir. CFT için abort sonrası antikor yanıtın en yüksek seviyelere çıktığı üçüncü ve altınca haftalar arasında testin yapılması önerilir (Rodolakis, 2001). CFT ayrıca aşı ve doğal enfekte hayvanların ayırımı yapamaz. Eğer bireysel hayvanlarda veya abort geçmişi olmayan sürülerde düşük titrelerle karşılaşılırsa sonuçlar dikkatle değerlendirilmelidir. 1/32' den düşük titreler *C.abortus* için non-spesifik kabul edilmelidir. Bu titrelere düşük oranda enfeksiyon da sebep olur. Şüpheli sonuçlarda Wester-Blot ile doğrulama yapılmalıdır (WEB_2, 2018).

C. abortus ve *C. pecorum* arasındaki antikor yanıtı indirekt mikroimmüno Floresans yöntemiyle ayırt edilebilse de bu yöntem rutin teşhiste kullanılmayacak kadar zaman alıcıdır.

ELISA CFT'ye göre daha duyarlı ve seçicidir. Monoklonal antikor teknolojisiyle üretilen kompetatif ELISA ve rekombinant antijen teknolojisi içeren indirekt ELISA yöntemleri CFT'ye göre daha duyarlı ve seçici bulunmuştur (Salti-Montesanto ve ark, 1997; Longbottom ve ark, 2002). Hiçbir serolojik yöntem aşı ve doğal enfekte hayvanları ayırt edememektedir. (Gerber ve ark, 2007).

2.9.2. Boyama Yöntemleri

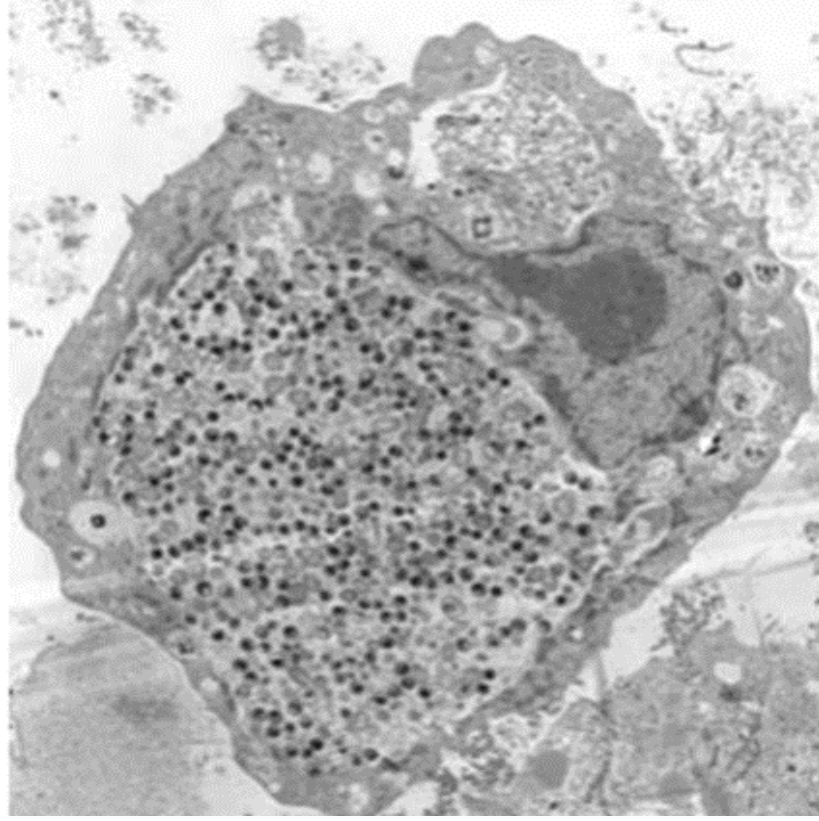
C. abortus, doku veya sıvaplardan yapılan boyalamalarla ve etkilenen dokuların incelenmesiyle teşhis edilebilir (Rodolakis, 2001). Eğer plasental materyal bulunamıyorsa abort sonrası annesi tarafından temzilenmemiş fetusun yüzeyinden ve abomasum içeriğinden ve vajenden alınan sıvaplar faydalıdır. Ancak bu sıvaplar plasental sıvaplara göre daha az sayıda etkeni içerir (WEB_2, 2018).

Bir çok farklı boyama yöntemi kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları Machiavello, Giemza, Ziehl-Neelsen, Stamp, Gimenez, Streptavidin- biotin boyama yöntemleridir (Szeredi ve Bacsadi 2002). Boyamalarda elementer cisimcikler kümeler halinde kırmızı renkli görülür. *Coxiella burnetii*'nin boyamalarda görünümü çok benzerdir. Bu yüzden hastalığın geçmişi iyi araştırılmalı, plasental lezyonlar da incelenmelidir. Serolojik testlerden ayırma yararlanılır. Ayrıca Floresan antikor testi (FAT) de bu amaçla kullanılır (WEB_2, 2018).

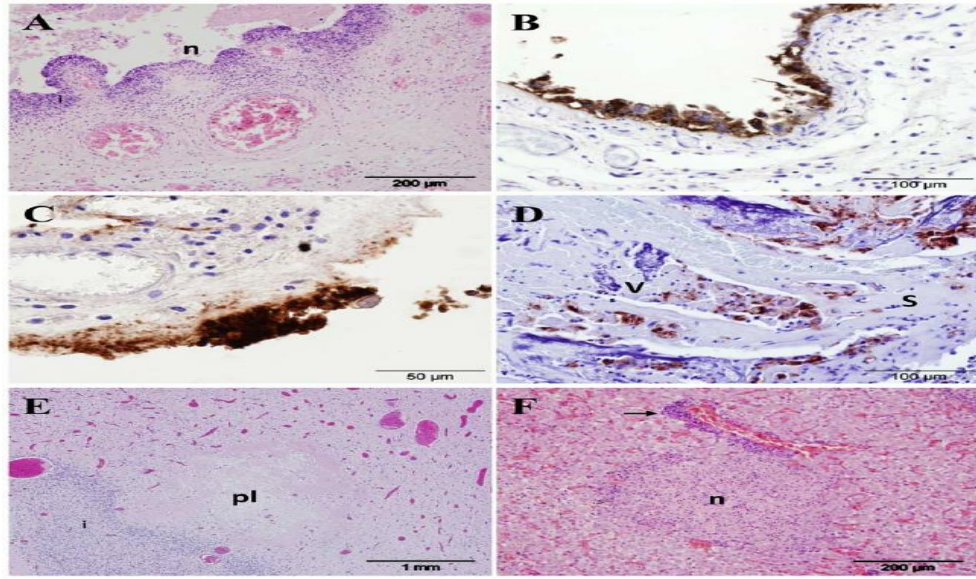
Dokulardan hazırlanan ince kesitlerin boyanmasıyla intrastoplazmik inklüzyon cisimleri görülür. Ancak daha iyi sonuçlara immunolojik boyamalar ile ulaşılır. İmmünperoksidaz yöntemi streptovilin- biotin boyamaya göre daha hızlı ve kolaydır (Szeredi

ve Bacsadi, 2002). Elektron mikroskopi, negatif kontrastla etkeni *Coxiella burnetii*'den ayırmada kullanılır (WEB_2, 2018)

Szeredi ve Bacsadi (2002) immunohistokimyasal, immunositokimyasal ve stamp boyamayı karşılaştırdığı çalışmada en doğru sonuçların immunohistokimyasal yöntemle alındığını, en az tespitin ise stamp boyama ile yapıldığını bildirmiştir.



Resim 1. Enfekte hücrede inklüzyon cisimciği içerisinde elementer (koyu ve küçük) ve retiküler (soluk ve büyük) cisimcikler (Aitken, 2007).



Resim 2. *C. abortus* enfeksiyonunda histopatolojik görünüm. A: Etkilenen plasental membranda nekroz, epitelinde dökülme, mezenşimde inflamasyon. (Hematoksilen eosin boyama) B ve C: Plasentada Klamidyal antijenin immunhistokimyasal görünümü. D: Plasentomda karankular septum (s) ve plasental vilinin (v) birbirine geçmiş görünümü. Villusun büyümesi ve nekrozu, septal dokuda Klamidyal antijen. E: Föetal önbeyinde periventriküler lökomalazi (pl) F: Föetal karaciğerin heamatoksilen-eosin boyaması, fokal nekroz (n) ve periportal inflamasyon (ok) (Longbottom ve ark, 2013).

2.9.3. Antijen Tespiti

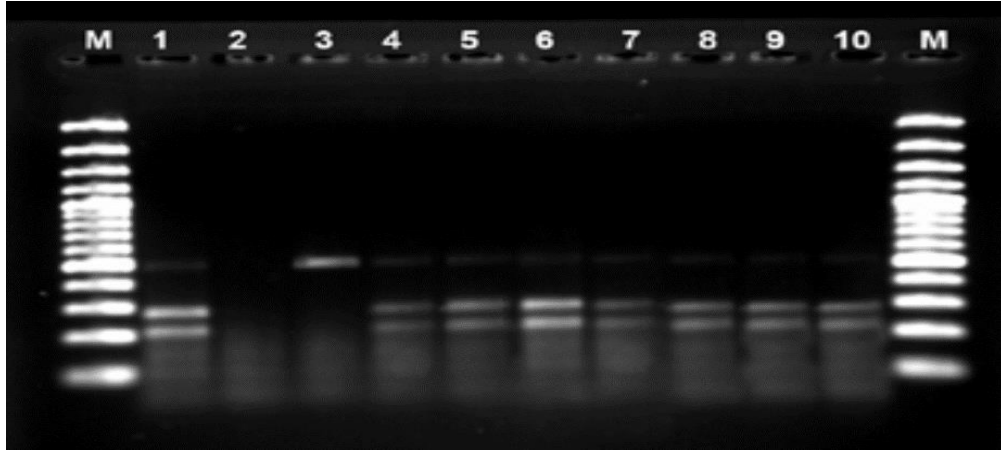
Antijen tespiti için kullanılan çeşitli ticari kitler vardır. Bunların içerisinde ELISA FAT'a göre daha duyarlıdır. Ancak her iki yöntem de grup bazında tespit yapabilir. Çünkü Klamidyaların ortak antijeni olan LPS' yi tespit eder. Histopatolojik olarak Klamidya LPS veya MOMP antijenine karşı antikorları kullanılarak antijen tespiti yapılır (WEB_2, 2018).

2.9.4. Moleküler Yöntemler

Konvansiyonel ve Real Time PCR, etkenin izolasyonuna gerek kalmadan doğrudan materyalden tespitini yapması açısından çok faydalıdır. Ancak sahada materyal ve çevre arasındaki çapraz bulaşma hatalı pozitifliklerin alınmasına sebep olabilir. Bir diğer sorun ise inhibitör faktörlerin etkisiyle hatalı negatifliklerin elde edilmesidir (WEB_2, 2018).

Konvansiyonel PCR yöntemleri etkenin 16S-23S rRNA bölgelerini (Everett ve Andersen, 1999) veya POMP genlerini hedef alır (Laroucau ve ark, 2001). Bu yöntemler RFLP analizi ile kombine edilerek *C. abortus*, *C. pcittaci* ve *C. pecorum* ayrımı ve aşı,

enfeksiyon ayrımı yapılabilmektedir (Laroucau ve ark, 2010; Wheelhouse ve ark, 2010; WEB_2, 2018).



Resim 3. Alu 1 restriksiyon enzimi kullanılarak yapılmış RFLP analizi. **M.**100 bp Ladder **1.** *C. abortus* S26/3. **2.** Negatif kontrol. **3.** *C. psittaci* 6BC **4-10.** Pozitif örnekler (Kalender ve ark, 2013).

Real Time PCR yöntemi DNA'nın çoğaltılmasını eş zamanlı olarak izleme imkanı verir. Jel elektroforez gibi ikincil bir işleme gerek yoktur. Bu sebeple tüm analiz kısa sürede tamamlanır. Real Time PCR konvansiyonel yöntemle göre çok daha az manipülasyon gerektirir ve uygulaması daha kolaydır. Reaksiyon cihazın ekranından izlenebildiği için analiz tamamlanmasa bile pozitif sonuçlar çok daha kısa bir sürede elde edilebilmektedir. Real Time PCR tespit yöntemlerinden biri SYBR Green yöntemidir. Bu yöntemde ışığa herhangi bir çift iplikçik oluşumuna bağlı olarak elde edilebilir. Örneğin primerlerin birleşip dimer oluşturması da ışımaya sebep olur. Bu sebeple SYBR green yönteminin duyarlılığı yüksekken özgüllüğü düşüktür. Yüksek duyarlılık ve özgüllük için floresan prob bazlı yöntemler kullanılmaktadır. Klinik mikrobiyolojide en çok 3 prob bazlı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar 5' Nükleaz (Taqman) problar, moleküler işaretçiler ve FRET hibridizasyon problarıdır. Bu tespit yöntemlerinin tümü, floresan rezonans enerji transferi olarak adlandırılan bir işlem olan iki bitişik boya molekülü arasındaki ışık enerjisinin transferine dayanır. Geliştirilen ilk Real Time floresan probları Taqman problarıdır. Bu problar 5' ucunda alıcı boya, 3' ucunda baskılayıcı boya olan kısa oligonükleotitlerdir. Bir ışık sinyali oluşturmak için 2 reaksiyon meydana gelmelidir. Öncelikle prob uygun DNA zincirine bağlanır. Ardından taq polimeraz enzimi primer uzaması sırasında probun 5' ucunu parçalayarak alıcı boyanın baskılayıcı boyadan kurtularak serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan boyanın yaptığı ışığa cihaz tarafından okunur (Espy ve ark, 2006).

Son yıllarda kolay standardize edilmesi, hızlı ve doğru sonuç vermesi sebebiyle hastalığın teşhisinde daha çok Real time PCR tercih edilmektedir (Sachse ve ark, 2009). Kullanılan Real Time yöntemlerinde en fazla *ompA* geni hedeflenmiştir. Bu gen bölgesi Klamidyal suşlar içerisinde en iyi ayrımın yapılabileceği gen bölgesidir. OİE tarafından önerilen iki Real Time PCR yöntemi (Livingstone ve ark, 2009; Pantchev ve ark, 2009) de aynı geni hedef alarak tür spesifik teşhise olanak sağlamaktadır.

Materyalden direkt ve hızlı teşhis yapma imkanı sunan DNA mikroarray hidridizasyon testi de oldukça etkili bir teşhis yöntemidir. Yöntemin rutin teşhis laboratuvarlarında kullanılabilecek kadar duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tek bir seferde 9 farklı Klamidya türünün ayrımı yapılabilmektedir (Borel ve ark, 2008).

C. abortus suşlarını tiplendirmek için çeşitli yöntemler denenmiştir. Monoklonal antikoların çapraz reaksiyonuna, *ompA* geninin restriksiyon analizine ve rRNA genlerinin filogenetik analizine dayanan yöntemler, konakçı, ilişkili hastalık veya suşların coğrafi kökenine ilişkin genetik çeşitlilikle ilgili çok az bilgi verebilmiş veya bu konuda hiç kanıt sunamamıştır. Bununla birlikte, daha sofistike bir moleküler tiplendirme aracı, yani amplifiye edilmiş fragman uzunluğu polimorfizm (AFLP) analizi, rRNA ve *ompA* sekansları yüksek oranda korunmuş olsa bile, Fransız suşlarının diğer kökenli olanlardan daha iyi ayrılmasını sağlamıştır. Bundan başka, Yunanistan'da izole edilen LLG ve POS adlı iki *C. abortus* suşunun, aynı alanda dolaşan diğer *C. abortus* suşlarından önemli ölçüde farklı olduğu bulunmuştur. Bu suşlar, benzersiz inklüzyon morfolojisi, polipeptit profillerindeki farklılıklar ve antikor çapraz reaktivitesi, rRNA, *ompA* ve *pmp* sekanslarının çeşitliliği ve diğer vahşi tip suşlara kıyasla plasenta ve fetüsü kolonize etmek için farklı davranış ve yeteneklerinin olması sebebiyle varyantlar olarak karakterize edilmiştir. MLVA ve MLST yöntemleri *C. abortus* suşlarını farklı genotiplere sınıflandırabilmektedir. 5 farklı VNTR lokusunun incelendiği MLVA yöntemi ile suşlar 7 farklı genotipe ayrılabilirken, MLST ile 5 farklı genotip elde edilmiştir (Siarkou ve ark, 2015).

MLVA etkeni daha fazla sayıda genotipe ayırabilmenin yanısıra abort materyalinden DNA ekstraksiyonunu takiben saflaştırma veya izolasyon gerektirmeksizin direkt çalışma imkanı sunar (Laroucau ve ark, 2009). MLVA ve MLST yöntemlerinin birlikte kullanılması daha fazla genotipik ayırım yapılabilmesini sağlamıştır (Siarkou ve ark, 2015).

Daha önce çalışmamızda tercih edilen Real Time PCR ve MLVA yöntemlerini kullanan çalışmalar yapılmıştır. Cezayir'de küçük ruminantlarda *C. abortus* Real Time PCR ile tespit edildikten sonra MLVA ile genotiplendirilmiş ve hepsi genotip 2 olarak bulunmuştur (Merdja ve ark, 2015). Çin'de Tibet sığırlarında *C. abortus* teşhis edildikten sonra MLVA

genotiplendirmesi yapılmış ve yine tümü genotip 2 olarak sınıflandırılmıştır (Li ve ark, 2015). Siarkou ve ark, (2015) ve Laroucau ve ark, (2009) çalışmalarında dünyanın çeşitli ülkelerinde izole edilmiş suşların yanında saha örneklerinden de MLVA genotiplendirme yapmışlardır.

2.9.5. İzolasyon

C. abortus, embriyolu tavuk yumurtası ve hücre kültüründe izole edilebilir. Hücre kültüründen özellikle yeni suşların tespitinde daha fazla yararlanır. Etken zoonotik olduğu için izolasyon ve identifikasyon prosedürleri biyogüvenlik düzeyi II laboratuvarlarda yapılmalıdır.

İzolasyon için en uygun materyaller, hastalıklı kotiledon, plasental membranlar, fetal organlar ve vaginal sıvıplardır. İzolasyon prosedürüne başlamadan önce herhangi bir gecikme yaşanacaksa izolasyon materyalinin taşıyıcı besiyerine alınması ve çalışma başlayana kadar -80°C veya -20°C de bekletilmesi gerekir. Sükroz/Fosfat/Glutamat besiyeri uygun bir taşıyıcıdır.

C. abortus'un izolasyonu için embriyolu tavuk yumurtası kullanılacaksa 6-8 günlük yumurtalar seçilmelidir. Yumurtalar daha sonra 37°C'de tutulur. İnokulasyondan 4-13 gün sonra embriyolar ölür. Yumurtaların sarı kese zarından hazırlanan sıvıplarda çok miktarda elementer cisimcik vardır.

C. abortus, diğer hücre kültürlerinde de izole edilebilir. En fazla tercih edilenleri McCoy, Buffalo Green Monkey (BGM) ve baby hamster kidney (BHK) 'dir (WEB_2, 2018).

2.10. Tedavi ve Kontrol

Enfeksiyondan korunmada ilk basamak hastalık etkeninin yayılmasını sınırlamaktır. Bu amaçla plaseenta, aborte fetus gibi enfekte materyaller yok edilmelidir. Doğum alanları her doğum sonrası etkili dezenfektanlarla dezenfekte edilmeli, abort yapan hayvanlar sürüden izole edilmelidir. Hastalığın görülmediği sürülere yeni dişi alımı Klamidyoz geçmişi olmadığı bilinen sürülerden yapılmalıdır. Böylelikle latent enfekte hayvanların sürüye katılması, dolayısıyla sürünün enfekte olmasının önüne geçilir (Dawson, 1988).

Tedavide tetrasiklinler etkenin çoğalmasını sınırlayıp abortları önlese de, etkenin saçılımına etki etmezler. Gebeliğin 105 ve 120. günlerine 20 mg/kg dozunda kas içi yolla

oksitetrasiklin uygulaması abortları önler (Rodolakis, 2001). Dawson (1988) oksitetrasiklin enjeksiyonlarının gebeliğin 100. gününden sonra 10-14 gün aralıklarla doğuma kadar tekrarlanmasını önermektedir. Salgın durumlarında tüm sürüye oksitetrasiklin uygulamak yavru kayıplarını azaltır ancak enfeksiyonu ortadan kaldırmaz. Ayrıca plasentada geri dönüşümsüz hasara neden olur. Bu nedenle sayıları azalsa da abortlar devam eder (Rekiki ve ark, 2006; Aitken, 2007). Tekrarlayan antibiyotik uygulamaları antibakteriyel direnç gelişimine neden olabilir. Bu nedenle antibiyotik uygulamaları sadece acil durumlarda tercih edilmelidir (Aitken, 2007). Tavsiye edilen korunma yöntemi hem abortları önlemesi hem de bakteri saçılımını engellemesi bakımından aşılamadır (Rodolakis, 2001).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada, 2017-2019 yılları arasında, T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nün sorumluluk alanında bulunan illerde (Bilecik, İstanbul, Edirne, Çanakkale, Tekirdağ, Kırklareli, Bursa, Balıkesir, Düzce, Yalova, Kocaeli, Sakarya) görülen ruminant abort vakalarından teşhis amacı ile Enstitü'ye gönderilen marazi maddeler kullanıldı. Numune seçiminde hayvan cinsi, abortun gerçekleştiği mevsim, sürünün durumu, vs. gibi herhangi bir kriter aranmadı.

Çalışmanın materyalini aborte fetüse ait iç organlar (akciğer, karaciğer, böbrek, dalak) ile mide sıvısı, anne hayvana ait plasental dokular ile vaginal sıvıların oluşturdu. Bu amaçla 267 sığır, 380 koyun, 70 keçi, 13 adet mandaya ait toplam 730 abort materyaline ait örnekler analiz edildi. Çalışılan materyallerin illere göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma örneklerinin illere ve hayvan türlerine göre dağılımı.

İl	Sığır	Koyun	Keçi	Manda	Toplam
Balıkesir	32	37	2	-	71
Bilecik	5	9	3	-	17
Bursa	26	58	11	2	97
Çanakkale	41	81	21	-	143
Düzce	32	3	-	4	39
Edirne	66	85	6	-	157
İstanbul	3	7	5	-	15
Kırklareli	17	49	14	-	80
Kocaeli	11	14	5	7	37
Sakarya	10	7	1	-	18
Tekirdağ	19	25	2	-	46
Yalova	5	5	-	-	10
Toplam	267	380	70	13	730

Araştırmanın yapılmasında, T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.04.2018 tarih, 187 sayı ve 07/2018 karar no ile Etik Kurul kararına gerek olmadığı bildirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir.

- Vortex (Velp Scientifica, İtalya)
- MagNALyser (Roche, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Hettich Micro 200R, Almanya)
- Kuru blok ısıtıcı (Allsheng MK 200-1, Çin)
- Real time PCR cihazı (Himedia insta Q96, Hindistan)
- Yatay elektroforez cihazı ve güç kaynağı (Fisher Scientific, ABD)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Hassas terazi (Shimadzu 8x4200 H, Japonya)
- UV transilluminatör (Vilber-Lourmat, Fransa)
- Biyogüvenlik kabini (Demair Class II Tip A, Türkiye)
- Genetik analizör (Applied Biosystems ABI 3130 XL, ABD)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop ND-1000, ABD)

3.1.3. DNA Ekstraksiyon Kiti

Çalışmada DNA ekstraksiyonunda DNeasy Blood & Tissue ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı. Kitin içeriğinde dokunun lize edilmesi amacıyla Proteinaz K enzimi, Buffer ATL ve Buffer AL, Yıkama solüsyonu olarak Buffer AW1 ve AW2, kolondaki DNA'nın eldesi amacıyla buffer AE solüsyonları ile toplama tüpleri ve kolonlar bulunmaktadır.

3.1.4. Mastermiks Kitleri

Real Time PCR analizi için 2x konsatrasyonda Real Time mastermiks kiti (Roche), MLVA için PCR işleminde ise Taqman 2x PCR Mastermiks kiti (Norgen) kullanıldı.

3.1.5. Agar Jel Elektroforez

Agar jel elektroforez işlemi için Agaroz (Grisp), 6x loading dye solüsyonu (Biomatik), 10 mg/ml etidyum bromid solüsyonu (Sigma-Aldrich) ve 100 bp DNA ladder (Bioron) kullanıma hazır olarak temin edildi.

3.1.6. Çözelti ve Tamponlar

3.1.6.1. Fosfat Tamponlu Tuz (PBS)

PBS, marazi maddelerin ekstraksiyonu öncesi homojenat hazırlamak amacıyla aşağıdaki şekilde hazırlandı:

10 mM pH 7.4 fosfat (PBS) tamponu hazırlamak için 1 litre saf suya 1.44 g sodyum dihidrojen fosfat (Na_2HPO_4), 0.24 g potasyum dihidrojen fostat (KH_2PO_4) karıştırılmıştır. Üzerine 8 g NaCl ve 0.2 g KCl tuzları ilave edilmiştir. Derişik NaOH ile tampon pH 7.4 'e ayarlandıktan sonra 121⁰C'de 15 dk otoklavlandı.

3.1.6.2. TAE

Tris, Asetat, EDTA (TAE) buffer 10X (Grisp) konstantrasyonunda ticari olarak temin edildi. Agar jel elektroforezde 1X konstantrasyonunda kullanılacak şekilde 100 ml 10X TAE buffer, 900 ml distile su ile karıştırılarak 1000 ml 1X TAE buffer hazırlandı.

3.1.7. Primer ve Problar

Real Time PCR için primerler ve prob Microsynth AG (İsviçre) firmasına hazırlatıldı. Prob FAM-6 boyası ile işaretletildi. MLVA primerleri Metabion International AG (Almanya) firmasına hazırlatıldı. Kapiller elektroforez için sadece forward primerler 5' ucundan FAM 6 boyası ile işaretli olarak sentezletildi. Sekans analizleri için primerler Sentromer (Türkiye) firmasına hazırlatıldı. Bu primerler MLVA için kullanılan primerler olup floresan boya ile

işaretlenmemiştir. Liyofilize halde, soğuk zincirde temin edilen primerler ve prob, firmaların talimatlarına göre nükleaz içermeyen su kullanılarak 100 µM olacak şekilde sulandırılarak stok hazırlandı. Çalışma sırasında kullanılacak primerler 10 µM olacak şekilde stoktan sulandırılarak primerler 100'er µl, prob 50'şer µl olacak şekilde porsiyonlandı ve numaralandırıldı (Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4).

Tablo 2. Real Time PCR Analizi primer ve prob özellikleri.

Primer	Sekans (5'-3')	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Baz Sayısı	OD	TM °C
CpaOMP1-F	GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA	7330.8	24	9.12	65.2
CpaOMP1-R	ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA	7707	25	7.44	60.9
CpaOMP1-S	6-FAM-TAAATACCACGAATGGCAAGTT GGTTTAGCG-TAMRA	10712.2	31	4.94	69.7

Tablo 3. MLVA primer özellikleri.

Gen bölgesi / Primer İsmi	Sekans (5'-3')	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Uzunluk (Baz)	OD	TM °C
CAB267/ ChlaAb_300-F	6-FAM-AGACCTAAAGCGCCACCTTCA	6882	21	6.4	61
CAB267/ ChlaAb_300-R	ATGCGCCAATCTATACGCTGA	6390	21	10.14	57.9
CAB398/ ChlaAb_457-F	6-FAM-GTACAAAAAAAAACGTAGCAGC AAGAA	8585	26	5.7	62
CAB398/ ChlaAb_457-R	CACGTTGGCAAGAAGCTGTGT	6486	21	10.84	59.8
CAB502/ ChlaAb_581-F	6-FAM-ACAGCACCAGCATTAGCCG	6305	19	8	59
CAB502/ ChlaAb_581-R	TGGATAGTTGTCGCTGGTGG	6235	20	11.96	59.4
CAB541/ ChlaAb_620-F	6-FAM-ATGCTATAATTGCTTAGTTTTT TTAACATTG	10033	31	8	62
CAB541/ ChlaAb_620-R	CACATGCCGCCCTGAAC	5160	17	11.93	57.6
CAB786/ ChlaAb_914-F	6-FAM-TTTAAAGTTTCCGTATCTTTGT AATCGAT	9401	29	6.4	62
CAB786/ ChlaAb_914-R	TTTTAGAATTCGCATCATTACCAGAA	7928	26	12.16	56.9

Tablo 4. Sekans analizleri için primer özellikleri.

Gen bölgesi / Primer İsmi	Sekans (5'-3')	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Baz sayısı	OD	TM °C
CAB267/ ChlaAb_300-F	AGACCTAAAGCGCCACCTTCA	6344	21	10.17	59.8
CAB267/ ChlaAb_300-R	ATGCGCCAATCTATACGCTGA	6390	21	10.14	57.9
CAB398/ ChlaAb_457-F	GTACAAAAAAAAACGTAGCAGCAAGAA	8047	26	14.38	58.5
CAB398/ ChlaAb_457-R	CACGTTGGCAAGAAGCTGTGT	6486	21	10.84	59.8
CAB502/ ChlaAb_581-F	ACAGCACCAGCATTAGCCG	5767	19	12.67	58.8
CAB502/ ChlaAb_581-R	TGGATAGTTGTTCGCTGGTGG	6235	20	11.96	59.4
CAB541/ ChlaAb_620-F	ATGCTATAATTGCTTAGTTTTTTAACATTG	9495	31	12.3	57.6
CAB541/ ChlaAb_620-R	CACATGCCGCCCTGAAC	5160	17	11.93	57.6
CAB786/ ChlaAb_914-F	TTTAAAGTTTCCGTATCTTTGTAATCGAT	8863	29	11.97	58.2
CAB786/ ChlaAb_914-R	TTTLAGAATTCGCATCATTACCAGAA	7928	26	12.16	56.9

Tüm işlem biyogüvenlik kabini içerisinde, soğuk zinciri bozmamak için soğutucu bloklar kullanılarak, probun olumsuz etkilenmemesi için karanlık ortamda yapıldı. Primerler kullanılana kadar ve her kullanım sonrası -20⁰C' de saklandı.

3.1.8. Referans Kontroller

PCR analizleri için pozitif kontrol olarak *C. abortus* S26/3 referans suşu (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Türkiye) , negatif kontrol olarak nükleaz içermeyen su (Roche, Almanya) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Aborte fetüslere nekropsi yapılarak akciğer, karaciğer, böbrek, dalak ve mide sıvısından alınan örnekler ekstraksiyon yapılana kadar seramik boncuklu tüplere (MagNALyser Green Beads) alınarak -20°C de saklandı. Ekstraksiyon öncesi oda ısısında çözdürüldükten sonra üzerlerine 500 µl PBS ilave edilerek MagNALyser'da 5000 rpm de 60 sn parçalanarak homojenat hazırlandı. Vajinal sıvı 1.5 ml steril PBS içinde vorteksleni ve elde edilen sıvı DNA ekstraksiyonunda kullanıldı. Tek olarak gönderilen organ ve dokulardan, plasental materyaller ve cenin mide sıvılarından homojenat hazırlanmadan, direkt DNA ekstraksiyonu yapıldı. Hazırlanan homojenatlar, organ, doku ve vaginal sıvı örnekleri ekstraksiyon yapılana kadar -20°C de saklandı. Ekstraksiyon, kitin üretici firmasının protokolünde belirtildiği gibi yapıldı. Ekstraksiyon öncesi kit içeriğinde konsantre halde bulunan buffer AW1 ve buffer AW2 şişe üzerinde belirtilen miktarda %96 etil alkol ile dilue edildi. Ekstraksiyon basamakları aşağıda açıklandı.

- 10-25 µg doku örneği küçük parçalara ayrılarak, 20-50 µg homojenat, veya 200 µl vaginal sıvı 1.5 ml'lik ependorf tüpüne kondu.
- Üzerine 180 µl buffer ATL ve 20 µl proteinaz K eklenerek 30 saniye süreyle vorteksleni. 56°C'de doku tamamen lize olana kadar (1-3 saat) kuru blok ısıtıcıda inkube edildi. İnkubasyon sırasında aralıklarla vorteksleme işlemi tekrarlandı.
- İnkubasyon sonrası 200 µl buffer AL eklenerek 15 saniye vorteksleni. Bu işlemden sonra 200 µl %96 etil alkol ilave edilerek tekrar 15 saniye vortekslenerek iyice karıştırıldı.
- Tüm içerik, içinde spin kolon bulunan 2 ml hacimli toplama tüpüne alındı ve 6000 g devirde 1 dk süre ile santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni toplama tüpüne koyuldu. Üzerine 500 µl buffer AW1 eklendi ve 6000 g'de 1 dk süre ile santrifüj edildi.
- Ardından toplama tüpü tekrar yenisi ile değiştirilerek spin kolona 500 µl buffer AW2 koyularak 20000 g de 3 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon temiz 1.5 ml'lik ependorf tüpe alınarak 100 µl Buffer AE damla damla filtrenin merkezine gelecek şekilde eklendi ve 6000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Ependorf tüpe geçen sıvı template DNA olarak kullanıldı.

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile ölçümler yapılarak belirlendi. DNA miktarları mastermiks kitlerinin prosedürlerine göre 250 ng/μl' yi geçmeyecek şekilde ayarlandı ve analiz edilene kadar -20⁰C'de saklandı.

3.2.2. Real Time PCR

C. abortus'un teşhisi amacıyla OIE tarafından da rutin teşhis laboratuvarlarında kullanılması önerilen yöntemlerden birisi olan Pantchev ve ark (2009)'nın bildirdikleri yönetime göre Real Time PCR analizi yapıldı. Seçilen primerler *C. abortus* DNA'sına spesifik olup *ompA* gen bölgesini çoğaltmaktadır. Bu gen bölgesi *C. abortus*'un major outer membran proteinini (MOMP) kodlamaktadır (Bush ve Everett, 2001). *OmpA* gen bölgesi *C. abortus*'un Real Time PCR ile teşhisinde en çok hedeflenen gen bölgelerinden biridir (Livingston ve ark, 2009; Pantchev ve ark, 2009). Yapılan çalışmada *ompA*, 16S ve 23S rRNA gen bölgelerinin sekansları incelenmiş ve Klamidyal türlerin ayrımında en uygun gen bölgesinin *ompA* olduğu görülmüştür. Yöntemin tespit limiti reaksiyon başına 2 inkluzyon oluşturan ünite (ifu)'dir (Pantchev ve ark, 2009).

3.2.2.1. Tespit Limitinin Belirlenmesi

C. abortus S26/3 referans suşu ekstrakte edilerek nükleaz içermeyen su ile 10 katlı seri dilasyonları hazırlandı. Her bir dilusyondan Real Time PCR analizi yapıldı ve pozitif sonuç veren son Cycle Threshold (CT) değeri yöntemin tespit limiti olarak belirlendi. Analizlerde, belirlenen değerden önce CT veren örnekler pozitif, sonrasındakiler ise negatif olarak yorumlandı.

3.2.2.2. Örneklerin Real Time PCR İncelenmesi

Reaksiyon karışımı toplam 25 μl olacak şekilde her bir primer 0.9 μM, prob 0.2 μM, template DNA ise 2 μl'dir. Template DNA'lar ekstraksiyon sonrası herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı. Bir örnek için mastermiks karışımı Tablo 5.' de gösterildi.

Tablo 5. Real Time PCR mastermiks karışımı.

Mastermiks İçeriği	Miktar (µl)
2x Hazır Real Time Mastermiks	12.5
CPA-F Forward primer (10 µM)	2.25
CPA-R Reverse primer (10 µM)	2.25
Prob (10 µM)	0.5
Nükleaz içermeyen su	5.5
Örnek DNA miktarı	2
TOPLAM	25

Örnek DNA'sı hariç mastermiks karışımı soğutucu bloklarda biyogüvenlik kabininde, düşük ışıktaki hazırlandı. Analizi yapılacak örnek sayısı ile bir pozitif ve bir negatif kontrolün toplamının %10 fazlası hesaplanarak karışım hazırlandı ve PCR reaksiyon tüplerine porsiyonlandı. Örnek DNA' ları başka bir odada ilave edilerek PCR reaksiyon tüpleri Real Time PCR cihazına yerleştirildi.

Amplifikasyon 95⁰C' de 15 dakikalık denatürasyon işleminin ardından 45 siklus 95⁰C' de 15 saniye denatürasyon ve 60⁰C' de 1 dakika bağlanma ve uzama basamaklarını içermektedir. PCR ısı koşullarının şematize edilmiş hali Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6. Real Time PCR amplifikasyon koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	95	15 dk	1
PCR Amplifikasyonu			
Denatürasyon	95	15 sn	45
Bağlanma ve Uzama	60	60 sn	

Pozitif kontrol olarak *C. abortus* S26/3 suşunun ekstraksiyonundan elde edilen DNA, Negatif kontrol olarak nükleaz içermeyen su kullanıldı. Analizin doğruluğu için pozitif kontrolün pozitif, negatif kontrolün negatif sonuç vermesi beklendi. Analizlerde eşik değeri otomatik olarak cihaz tarafından belirlendi. Pozitif sonuç veren örnekler için DNA' lar MLVA yapılmak üzere +4⁰C' de saklandı.

3.2.3. MLVA

MLVA için Laroucau ve ark (2009)'nın çalışmasındaki yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Laroucau ve ark (2009) çalışmalarında *C. abortus* S26/3 genomunda 6 bp'den büyük tekrar eden 34 gen bölgesi belirlemiş ve ruminant abortlarına ait 34 *C. abortus* izolatu üzerinde yapılan çalışmada bu gen bölgelerinden 5 tanesinin değişken olduğunu saptamışlardır. Bu gen bölgeleri ile yapılan MLVA ile 6 farklı genotip tanımlanmış daha sonra aynı yöntemle yapılan başka bir çalışmada 7. genotip tanımlanmıştır (Siarkou ve ark, 2015). *C. abortus* S26/3 referans suşunun MLVA için primerlerin bağlanma bölgeleri *C. abortus* genomundan (Sekans ID: CR848038.1) bulunarak her bir gen bölgesi için olması gereken ampikon büyüklükleri gösterildi (Tablo 7.).

Tablo 7. Multilokus VNTR analizinde *C. abortus* S26/3 için primer bağlanma bölgeleri ve ampikon büyüklükleri.

Gen Bölgesi/ Primer	Primer Bağlanma Bölgeleri	Büyük lük
CAB267/ ChlaAb_300	AGACCTAAAGCGCCACCTTCA ATATTTAAAAGCTCGATCGCTCAGAG ATTCTAAAGATACCTTAGTGGTATGCATTGCACACGTAGTTGCATAA GCAGATTGCCAAAAGATATTGCTTACGAAATCACCTTTGTGATCGGT TTTTATGTGATCGGTTTGTGTTTGTGTATCTTGAGTTTCTTGAATTTTC GGAAGCGTGATCAGTATCTTCAGCGTATAGATTGGCGCAT	228 bp
CAB398/ ChlaAb_457	GTACAAAAAAAACGTAGCAGCAAGAA AACAGCGACTAAAGCTGTTC GTAAACCTGCTAGGAAGGCTACTGCTAAGAAGACGGCGACGAGAA AGCCTGCAGTTAAAAAGGCAGTTCGCAAGACAGCTGCGAAAAAAGC TACTGTGCGTAAGACTGTTAGCAAAATGACAGTACGCAAGACTGTA GCGAAAAAAGCTACTGCTAAGAAGACGGCGACAAGAAAGCCTGCG GCGAGAAAGACGGTCCGTAAGACAGCTGCGAAAACAGCGGCTACTC GCAAGCCTGCCGCTAGAAAAGCCGTAGCAAAACCTGCTATGTCATG CCATAAGCATCACAAACACACAGCTTCTTGCCAACGTG	358 bp
CAB502/ ChlaAb_581	ACAGCACCAGCATTAGCCGCTTCCATAATTTCCCGACCTGCTTCAGT AACTACAGAGTACCCATGTTTAACTAACCCTATGTTTAACTAATAGAT ATCCTATAGTCTGAGCTTTTTATAATTTTCATCTGTAGGGCAGAGA CCACCAGCGACAACCTATCCA	161 bp
CAB541/ ChlaAb_620	ATGCTATAATTGCTTAGTTTTTTTAAACATTGTTTTTCGTCTTTATGAGA ATAGCTCCTCATTCTGTTAAGTTCTTTTTAAGTTCTTTTTAAGTTC TTTTAATAAAGAGCCCACTTATTGTGATAAAATAGTGTCTAAATTAG ATAACTACTTCTATTTCCGGCGGAAACAAATAGAAATCGTCGGAAG AAATGAACAAACTCAGGAAATCATCTGCATGTCCA GTTCAGGGCGG CATGTG	241 bp
CAB786/ ChlaAb_914	TTTAAAGTTTCCGTATCTTTGTAATCGAT TGTTTTCCAACCTGCGGAA ACAAAAGGGCATTCTTATTAAAACGCTTCCTTCTGTGTTTCATTATT ATGAACAGGCTTATTATGAACAGGCTTATTCATATTTTCTCCTTAAA CAATTA TTCTGTAATGATGCGAATTCTAAAA	174 bp

*Sarı ile işaretli kısımlar primerlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir. Kalın yazılmış harfler tekrar ünitelerinin başlangıçlarıdır.

Yöntemde belirlenen gen bölgeleri, tekrar ünitelerine göre analiz sonucunda olası amplicon büyüklükleri Tablo 8.'de verilmiştir.

Tablo 8. MLVA için gen bölgeleri, tekrar üniteleri ve olası amplicon büyüklükleri.

Gen bölgesi/ Primer	Tekrar Ünitesi	1	2	3
CAB267/ ChlAb_300	9 bp	209 bp	218 bp	227 bp
CAB398/ ChlAb-457	72 bp	358 bp	430 bp	-
CAB502/ ChlAb_581	15 bp	146 bp	161 bp	-
CAB541/ ChlAb_620	11 bp	219 bp	230 bp	241 bp
CAB786/ ChlAb_914	15 bp	159 bp	174 bp	-

Çalışmada Laroucau ve ark (2009)'nın yönteminden farklı olarak amplicon büyüklüklerinin tespitinde agaroz jel elektroforez yerine bant büyüklüklerini daha iyi ayırt etme imkânı sağlayan kapiller jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır.

3.2.3.1. PCR

Reaksiyon toplam 20 µl mix içerisinde 10 µl 2x Mastermix, 1'er µl 10 qmol primerler, 5 µl nükleaz içermeyen su ve 3 µl template DNA ile gerçekleştirildi.

Tüm *C. abortus* pozitif DNA örnekleri ve pozitif kontrol olarak *C. abortus* S26/3 suşu DNA'sı ile her bir gen bölgesi için floresan boya ile işaretli primerler ile ayrı ayrı konvansiyonel PCR analizi yapıldı (Tablo 9.).

Tablo 9. Konvansiyonel PCR amplifikasyon koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	95	15 dk	1
PCR Amplifikasyonu			
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	58	30 sn	40
Uzama	72	45 sn	
Son Uzama	72	10 dk	1

PCR işlemi tamamandıktan sonra elde edilen ürünler agar jel elektroforez yapılana kadar +4 C'de, agar jel elektroforez sonrası kapiller elektroforez için ise -20⁰C'de karanlıkta muhafaza edildi.

3.2.3.2. Agaroz Jel Elektroforez

Elektroforez işlemi için agaroz jel aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- 1.5 gram agaroz tartılarak 250 ml erlen içerisine konuldu.
- 100 ml, 1X TAE buffer erlene ilave edildi.
- Hafifçe karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında her 1 dk'da tekrar elle karıştırılarak toplamda 3 dk kaynatıldı.
- Karışım 50-60⁰C'ye soğuyunca 5 µl etidium bromid ilave edilerek etidium bromid konsantrasyonu 0.5 µg/ml'ye ayarlandı.
- Karışım tarak yerleştirilmiş jel standına dökülerek 30 dk donması beklendi.
- Jel donduktan sonra tarak jelden çıkarıldı ve jel standı elektroforez tankına yerleştirildi.
- Tank jelin üzerini kapatacak şekilde 1X TAE ile dolduruldu.

PCR ürünlerini jele yüklemek için her ürün için 1'er µl loading dye bir parça parafilm üzerine koyuldu. 5'er µl PCR ürünü loading dye ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi. Ürün büyüklüklerinin kontrolü için 100 bp DNA ladder'dan 5 µl ilk kuyucuğa koyuldu. Yükleme işlemi bittikten sonra tankın kapağı kapatılarak tankın tam düz zeminde olduğu su terazisi ile kontrol edildikten sonra güç kaynağı 80V 300mA akıma ayarlanarak ürünler 60 dk süre ile yürütüldü. Sonuçlar UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuçlar daha önce bildirildiği büyüklüklerde (Tablo 6.) bant varlığı ve mevcut yerleri açısından değerlendirildi. Beklenen büyüklüklerde bant veren ürünler kapiller elektroforez için -20⁰C'de saklandı. Bant görülmeyen örnekler için PCR analizi tekrarlandı.

3.2.3.3. Kapiller Elektroferez

Agar jel elektroferez sonrası ampikonların tam büyüklüklerini belirlemek amacıyla kapiller jel elektroferez işlemi hizmeti alımı ile Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Moleküler Teşhis Laboratuvar'ında, ABI 3130 XL cihazı kullanarak gerçekleştirildi.

Elektroferez işlemi sonucunda ampikon büyüklükleri Tablo 8.'de bildirildiği şekilde yorumlanarak her örneğin 5 gen bölgesinin tekrar eden bölümlerinin sayısı bulundu ve Tablo 10'daki verilere göre genotipleri belirlendi (Laroucau ve ark, 2009).

Tablo 10. Tekrar sayılarına göre genotipik sınıflandırma.

Genotip	ChlaAb-300	ChlaAb-457	ChlaAb-581	ChlaAb-620	ChlaAb-914
1	3	1	1	1	1
2	3	1	1	2	1
3	3	1	2	2	1
4	3	1	2	3	1
5 (S26/3)	3	1	2	3	2
6	2	2	1	1	1

3.2.4. Sekans Analizi

Öncelikle *C. abortus* S26/3 referans suşu ekstrakte edilerek 5 MLVA gen bölgesi için işaretlenmemiş primerler kullanılarak PCR yapıldı. Kapiller elektroferez sonucu farklı bulunan sonuçlar için aynı yöntem kullanıldı. Sekans analizi için primerler 5 pmol olarak dilue edilip soğuk zincir şartlarında PCR ürünleri ile birlikte Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderildi. Laboratuvarda sekans analizi ABI 3130 XL cihazı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak değerlendirildi. Bu amaçla referans suşun MLVA gen bölgelerinin sekansları aynı suşun daha önce yayımlanan sekansları (Sekans ID: CR848038.1) ile karşılaştırıldı. Beklenen ampikon büyüklüklerinden farklı bulunan örneklerin sekans dizileri, benzer dizilerin olup olmadığı, varsa farklılığın nereden kaynaklandığı yönlerinden araştırıldı.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

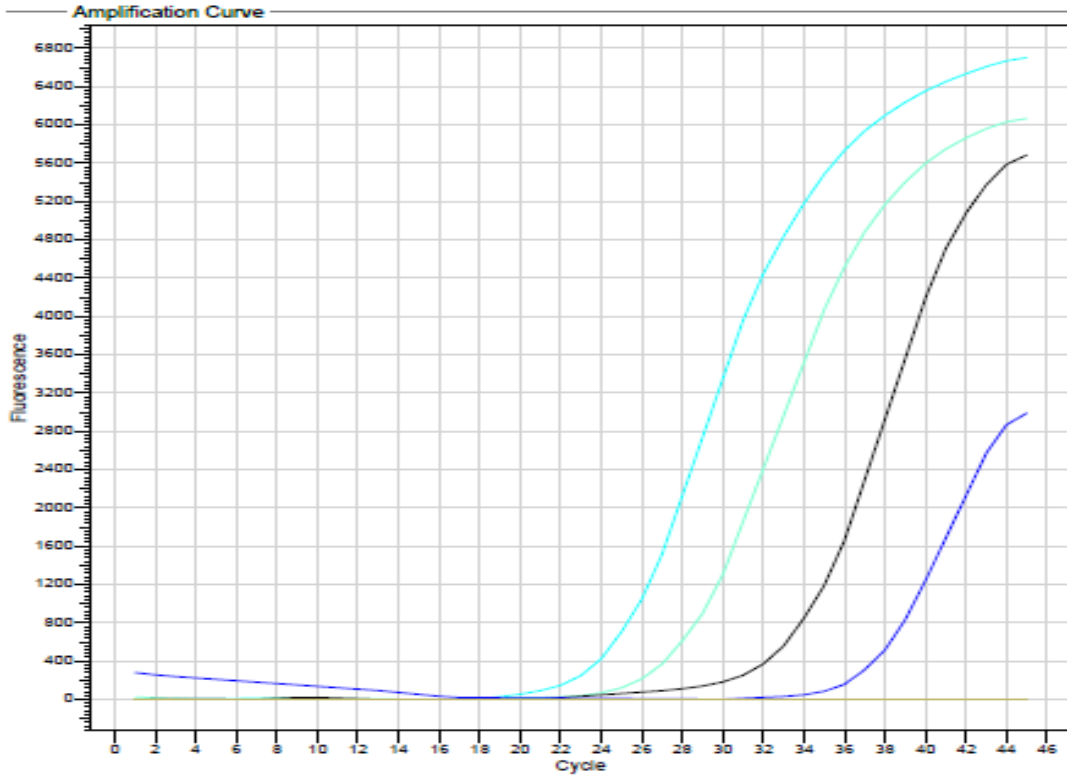
Real Time PCR analizi sonrasında bulunan pozitifliklerde illere göre anlamlı bir farklılık olup olmadığı istatistiki olarak Pearson Ki-kare testi ile değerlendirildi. Bu amaçla Predictive Analytics Software (PASW)- SPSS (Statistical Package for the Social Science) versiyon 18 paket programı (IBM, SPSS Inc, Chicago, IL) kullanıldı. Küçük ruminantlardaki pozitifliklerin ve toplam pozitifliklerin dağılımları ayrı ayrı araştırıldı. Test sonucu %95 güven aralığında, P değerinin 0.05'den küçük olması durumunda pozitifliklerin illere göre farklılığının anlamlı olduğu, 0.05'den büyük değer, anlamlı olmayan bir farklılığı gösterdiği şeklinde değerlendirildi (Büyüköztürk ve ark, 2012).

4. BULGULAR

4.1. Real Time PCR

4.1.1. Analizin Tespit Limitinin Belirlenmesi

Ekstrakte edilen *C. abortus* S26/3 DNA'sının 10 katlı seri dilusyonları hazırlandı. 10^{-1} dilusyon birinci örnek olacak şekilde Real Time PCR analizi yapıldı. Floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değer (eşik değeri) otomatik olarak cihaz tarafından belirlendi. Analizin tespit limiti 10^{-4} dilusyonda 36.35 CT olarak bulundu. Çalışılan örneklerde 36.35 CT'den önceki değerler pozitif sonuç olarak kabul edildi. *C. abortus* S26/3 DNA'sının dilusyonlarının amplifikasyon eğrileri Şekil 3'de, CT değerleri Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 3. *C. abortus* S26/3 DNA'sının dilusyonlarının amplifikasyon eğrileri.

Quan. Analysis Result

#	Well	Assay Item	Property	Dye	Ct	Ct Aver.	Ct SD	Cal. Con.	Con. Aver.	Con. SD	Sample ID
1	A01	Target1	Unknown	FAM	22.59	22.59	0				dilusyon01
2	A02	Target1	Unknown	FAM	25.88	25.88	0				dilusyon02
3	A03	Target1	Unknown	FAM	30.29	30.29	0				dilusyon03
4	A04	Target1	Unknown	FAM	36.35	36.35	0				dilusyon04
5	A05	Target1	Unknown	FAM		0	0				dilusyon05
6	A06	Target1	Unknown	FAM		0	0				dilusyon06
7	A07	Target1	Unknown	FAM		0	0				dilusyon07

Şekil 4. Standart suşun dilusyonlarının CT değerleri.

Saptanabilen en düşük DNA dilüsyonu 10^{-4} olarak tespit edildi. DNA dilüsyonu 10^{-5} olacak şekilde dilüe edilen örnekte ise amplifikasyon sinyali elde edilmedi.

4.1.2. Örneklerin İncelenmesi

Çalışılan toplam 730 materyalin 87'sinden (%11.9) Real Time PCR analizi ile *C. abortus* DNA'sı tespit edildi. Hayvan türlerine göre 63 örnek ile (%72.4) en çok koyun, takiben 15 örnek ile (%17.2) keçi ve 8 örnekle sığır (%9.2) örneği pozitif bulundu. Manda örneklerinden 1 adet pozitiflik tespit edildi. Pozitif örneklerin illere göre dağılımı incelendiğinde 23 pozitif örnekle en fazla pozitiflik Edirne'de bulunurken, 19 pozitif örnekle Çanakkale ve 16 pozitif örnekle Kırklareli Edirne'yi takip eden iller olmuştur. En az pozitiflik 3'er örnekle Kocaeli, Tekirdağ ve Düzce'de ve 1 pozitiflikle Yalova'da görüldü. Sakarya'da ise pozitifliğe rastlanmadı. Pozitif örneklerin hayvan türlerine ve illere göre dağılımı Tablo 11.'de verilmiştir.

Tablo 11. Hayvan türlerine ve illere göre Real Time PCR sonuçları.

İL	Koyun	Pozitif	Keçi	Pozitif	Sığır	Pozitif	Manda	Pozitif	Toplam Örnek	Toplam Pozitif (%)
Balıkesir	37	6	2	-	32	1	-	-	71	7 (9.8)
Bilecik	9	-	3	1	5	-	-	-	17	1 (5.9)
Bursa	58	7	11	1	26	1	2	-	97	9 (9.3)
Çanakkale	81	16	21	2	41	1	-	-	143	19 (13.3)
Düzce	3	1	-	-	32	1	4	1	39	3 (7.7)
Edirne	85	16	6	3	66	2	-	-	157	21 (13.4)
İstanbul	7	3	5	1	3	-	-	-	15	4 (26.7)
Kırklareli	49	11	14	5	17	-	-	-	80	16 (20)
Kocaeli	14	1	5	2	11	-	7	-	37	3 (8.1)
Sakarya	7	-	1	-	10	-	-	-	18	0 (0.0)
Tekirdağ	25	2	2	-	19	1	-	-	46	3 (6.5)
Yalova	5	-	-	-	5	1	-	-	10	1 (10)

Hayvan türlerine göre pozitif örnekler materyallere göre karşılaştırıldığında:

- 70 keçi örneğinden 15 pozitiflik tespit edilmiş olup pozitiflik yüzdesi %21.4' dür.
- 380 koyun örneğinden 63 pozitiflik tespit edilmiş olup pozitiflik yüzdesi %16.6'dır.
- 13 manda örneğinden 1 pozitiflik tespit edilmiş olup pozitiflik yüzdesi %7.7'dir.
- 267 sığır örneğinden 8 pozitiflik tespit edilmiş olup pozitiflik yüzdesi %3.0'dır.

Real Time PCR analizinin hastalığın esas konakçısı olan küçük ruminantlardaki sonuçlarının illere ve hayvan türlerine göre dağılımı ve bulunan pozitiflik yüzdeleri Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Küçük ruminantlardaki Real Time PCR analizi sonuçları.

İl	Toplam koyun	Pozitif Sonuç	%	Toplam Keçi	Pozitif Sonuç	%	Toplam Küçük ruminant	Pozitif Sonuç	%
Balıkesir	37	6	16.2	2	-	0	39	6	15.4
Bilecik	9	0	0	3	1	33.3	12	1	8.3
Bursa	58	7	12.1	11	1	9.1	69	8	11.6
Çanakkale	81	16	19.8	21	2	9.5	102	18	17.6
Düzce	3	1	33	-	-	-	3	1	33.3
Edirne	85	16	18.8	6	3	50	91	19	20.9
İstanbul	7	3	42.9	5	1	20	12	4	33.3
Kırklareli	49	11	22.5	14	5	35.7	63	16	25.4
Kocaeli	14	1	7.1	5	2	40	19	3	15.8
Sakarya	7	-	-	1	-	-	8	0	0.0
Tekirdağ	25	2	8	2	-	0	27	2	7.4
Yalova	5	-	-	-	-	-	5	0	0.0
Toplam	380	63	16.6	70	15	21.4	450	78	17.3

4.2. İstatistiksel Analiz

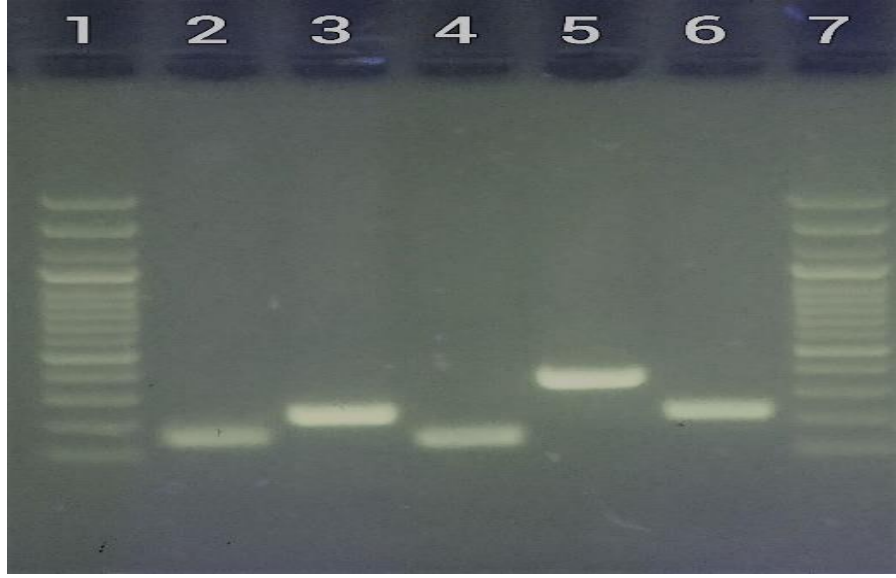
Pearson Ki-Kare (χ^2) testine göre: sonuçlar hem tüm hayvanlar, hem küçük ruminantlar için şehirlere göre değerlendirildiğinde pozitiflikler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($0.159 > 0.05$, $0.273 > 0.05$). Ki-Kare test sonuçları Tablo 13’ de verilmiştir.

Tablo 13. Real Time PCR sonuçlarındaki farklılıkların istatistiki değerlendirmesi.

χ^2 testi	χ^2 value	P value
Şehirler ve Pozitiflik (Küçük Ruminant)	13.326	0.273
Şehirler ve Total Pozitiflik	15.540	0.159

4.3. MLVA

Real Time PCR analizi ile *C. abortus* yönünden pozitif bulunan 87 örneğin MLVA analizi sonucunda genotipleri tespit edildi. *C. abortus* S26/3 suşunun MLVA gen bölgelerinin agaroz jel görünümü Resim 4.’ de verilmiştir.



Resim 4. *C. abortus* S26/3 suşunun MLVA profilinin agaroz jel görünümü.

1.100 bp ladder 2. ChIAb-914 3. ChIAb-620 4. ChIAb-581 5. CHLAB-457 6. ChIAb-300 7. 100 bp ladder.

Toplam 87 örneğin 81 (%93.1)'i genotip 2 olarak bulundu. Genotip 2'yi 4 (%4.6) örnekle genotip 5, 1 (%1.1) örnekle genotip 4 ve 1 (%1.1) örnekle genotip 3 takip etti (Tablo 14.). Toplam 63 koyuna ait *C. abortus* DNA'sından 60 (%95.2)'i genotip 2, 3 (%4.8)'ü ise genotip 5'tir. 15 keçi örneğinin tamamı genotip 2 olarak sınıflandırıldı. Sığırlarda ise 8 örneğin 6 (%75)'sının genotip 2, birer tanesinin (%12.5) genotip 4 ve genotip 5 olduğu görüldü. Tek pozitif manda örneği genotip 3 olarak sınıflandırıldı. Hayvan türlerine göre genotipik sınıflandırma verileri Tablo 15.'de verilmiştir.

Tablo 14. *C. abortus* genotiplerinin hayvan türlerine göre dağılımı.

Genotip	Hayvan Türü	Adet	Toplam (%)
2	Koyun	60	81 (%93.1)
	Keçi	15	
	Sığır	6	
5	Koyun	3	4 (%4.6)
	Sığır	1	
4	Sığır	1	1 (%1.1)
3	Manda	1	1 (%1.1)

Tablo 15. Hayvan türlerine göre genotipik sınıflandırma.

Hayvan Türü	Genotip 2 (%)	Genotip 3 (%)	Genotip 4 (%)	Genotip 5 (%)
Koyun	60 (%95.2)	-	-	3 (%4.8)
Keçi	15 (%100)	-	-	-
Sığır	6 (%75)	-	1 (%12.5)	1 (12.5)
Manda	-	1 (%100)	-	-

4.4. Sekans Analizi

MLVA öncesinde referans *C. abortus* S26/3 suşu sekanslanarak dizinler üzerinde analizde kullanılacak her gen bölgesinin tekrar eden bölgeleri bulunarak tekrar sayıları doğrulandı (Tablo 16).

Tablo 16. *C. abortus* S26/3 suşunun MLVA gen bölgelerinin sekans dizinleri.

Gen Bölgesi	Sekans Dizini	Tekrar Sayısı
CAB267	ATACCTTAGTGGTATGCATTGCACACGTAGTTGCATAAGCAGATTGC CAAAAGATATTGCTTACGAAATCACCTTTGTGATCGGTTTTTATGTGA TCGGTTTGTGT TTGTGTATCTTGAGTTTCTTGAATTT CGGAAGCGTGA TCAGTATCTTC AGCGTATAGATTGGCG	3
CAB398	TGCTAGGAAGGCTACTG CTAAGAAGACGGCGACGAGAAAGCCTGCA GTTAAAAAGGCAGGCAAGACTGTAGCGAAAAAGCTACTG CTAAGA AGACGGCGACAAGAAAGCCTGCGGCGAGAAAGACGGTCCGTAAGAC AGCTGCGAAAACAGCGGCTACTCGCAAGCCTGCCGCTAGAAGAAAG ACGGTCCGTAAGACAGCTGCGAAAACAGCGGCTACTCGCAAGCCTGC CGCTAGAA	1
CAB502	ACTACAGAGT ACCCATGTTTAACTAACCCATGTTTAACTA ATAGATAT CCTATAGTCTGAGCTTTTTTATAATTTTCATCTGTAGGGCAGAGACCA CCAGC	2
CAB541	TAAGTTCTTTTTAAGTTCTTTTTAAGTTCTTTT AATAAAGAGCCCACTT ATTGTGATAAAATAGTGTCTAAATTAGATAACTACTTCTATTTTCGGCG GGAAACAAATAGAAATCGTCCGAAATGAACAACTCAGGAAATCATC TGCATGTCCAGTTCAGGGCGGCATGTG	3
CAB786	TTTCTTATTAACGCTTCCTTCTGTGTTCA TTATTATGAACAGGCTTAT TATGAACAGGC TTATTCATATTTTCTCCTTAAACAATTATTCTGGTAATG ATGCGAATTCTA	2

*Sarı işaretli kısımlar tekrar eden bölgeleri göstermektedir. Kalın yazılmış harfler tekrar eden bölgelerin ilk bazlarını ifade eder.

Kapiller elektroforez sonucuna göre bir koyun DNA örneği mevcut MLVA genotiplerinden ayrı bir genotip özelliği gösteriyordu. Sonucu doğrulamak için bu DNA'nın her MLVA gen bölgesi ayrı ayrı sekanslandı. Sekans dizileri incelendiğinde kapiller elektroforezde 212 bp (2 tekrar) olan CAB267 gen bölgesinin üzerinde tekrar eden bölgeler tespit edildi ve tekrar sayısının 3 olduğu görüldü. Amplikonun *C. abortus* S26/3 genomuna göre 15 bp eksik bir bölge içermesi sebebiyle daha küçük olduğu anlaşıldı (Resim 5.). Sekans sonucuna göre genotipi genotip 2 olarak tespit edildi.

Chlamydomphila abortus strain S26/3, complete genome

Sequence ID: [CR848038.1](#) Length: 1144377 Number of Matches: 1

Range 1: 300510 to 300691 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
239 bits(129)	3e-59	167/182(92%)	15/182(8%)	Plus/Plus
Query 1	TTCTAAAGATACCTTAGTGGTATGCATTGCACACGTAGTTGCATAAGCAGATTGCCAAAA	60		
Sbjct 300510	TTCTAAAGATACCTTAGTGGTATGCATTGCACACGTAGTTGCATAAGCAGATTGCCAAAA	300569		
Query 61	GATATTGCTTACGAAATCACCTT-----TGTGATCGGTTTGTGTTTGTGT	105		
Sbjct 300570	GATATTGCTTACGAAATCACCTTGTGATCGGTTTTATGTGATCGGTTTGTGTTTGTGT	300629		
Query 106	ATCTTGAGTTTCTTGAATTCGGAAGCGTGATCAGTATCTTCAGCGTATAGATTGGCGCA	165		
Sbjct 300630	ATCTTGAGTTTCTTGAATTCGGAAGCGTGATCAGTATCTTCAGCGTATAGATTGGCGCA	300689		
Query 166	TA 167			
Sbjct 300690	TA 300691			

Resim 5. CAB267 gen bölgesi 212 bp büyüklükte bulunan bir suşun sekans analizi.

5. TARTIŞMA

C. abortus birçok hayvan türünde genellikle abortla seyreden hastalığa sebep olan Gram negatif, zorunlu hücre içi, zoonoz bir bakteridir. Dünyada özellikle küçük ruminantlarda en çok tespit edilen abort etkenlerinden biridir. Etkenin oluşturduğu enzootik abort enfeksiyonu hemen hemen tüm dünyada görülür (Rodolakis, 2001; Szeredi ve Bacsadi 2002; Givens ve Morally, 2008).

Hastalık Yeni Zelanda ve Avustralya hariç tüm dünyada yaygındır. Avrupa'da ise en önemli abort etkenlerinden biridir (Rekiki ve ark, 2002; Stuen ve Longbottom, 2011; Essig ve Longbottom, 2015). Türkiye'nin komşularında yapılan çalışmalarda da seropozitiflikler elde edilmiştir. Bisias ve ark (2010) Yunanistan'da koyunlarda %14.9, keçilerde %21.2 seropozitiflik belirlemiştir. Irakta yapılan serolojik çalışmalarda *C. abortus* seropozitiflik oranları %11.2 ve %11.4 (Al-Dabagh, 2014; Fahad ve Salman, 2017) olarak bulunmuştur. İran'da ise seroprevalans değeri küçük ruminantlarda %26.5 olarak bildirilmiştir (Esmaeili ve ark, 2015).

Ülkemizde çeşitli illerde ve farklı zamanlarda yapılan serolojik çalışmalarda %1.82 ile %32.0 arasında değişen oranlarda seropozitiflikler bulunmuştur. Duman ve Durak (1998) tarafından Konya ilinde atıklardan yapılan çalışmada CFT ile %20.0 seropozitiflik tespit edilmiştir. Çaya ve arkadaşlarının 2006 yılında Güneydoğu ve Akdeniz bölgesindeki illeri kapsayan çalışmalarında sırasıyla Kahramanmaraş'ta %30.0, Hatay'da %27.0, Mersin'de %23.5, Kilis'te %20.0, Gaziantep'te %16.8, Şanlıurfa'da %16.7, Osmaniye'de %9.5, Adıyaman'da %5.0, Adana'da %2.5 oranlarında seropozitiflik saptanmıştır. Kars ilinde Gökçe ve ark (2007) tarafından yapılan çalışmada abort yapan koyunlarda %13.9 ve sığırlarda %8.33 oranında seropozitiflik saptanmıştır. Otlu ve ark (2007)'nin yine Kars'ta abort yapan koyunlarda yaptıkları çalışmada seropozitiflik %5.4 oranında bulunmuştur. Küçükayan ve ark (2007) çalışmalarında Etlik Merkez Veteriner Enstitüsü'nün sorumluluk alanına giren İç Anadolu Bölgesindeki illerden gelen atık fetüs ve kan serumlarıyla yaptıkları çalışmada %1.8 oranında Klamidiyozis'e karşı antikor bulmuşlardır. Öztürk ve ark (2016) Burdur ilinde koyunlarda hastalık prevalansını ELİSA ile %32.0 olarak tespit etmişlerdir. Karagül ve ark (2019) Düzce ilinde yaptıkları serolojik çalışmayla *C. abortus*'un seroprevalansını %20.8 olarak belirlerken pozitif sürülerin oranı %42.8'dir. Ancak bu çalışmaların hiçbiri Marmara bölgesindeki illeri kapsamamaktadır. Marmara bölgesinde *C. abortus*'un prevalansı ile ilgili yayınlanmış bir veri bulunmamaktadır. Ülkemizde enzootik aborta yönelik aşı

yapılmamaktadır. Ayrıca ithalatına izin verilmiş *C. abortus* aşısı da yoktur (WEB_1, 2020). Bu nedenle, her ne kadar serolojik testlerde kros reaksiyonlar sebebiyle hatalı pozitiflikler görülebilirse de, bu konu ile ilgili olarak yurdumuzda yapılan çalışmalarda saptanan yüksek seroprevalans değerleri enfeksiyonların etiyolojik etkeninin *C. abortus* olabileceğini düşündürmektedir. Serolojik çalışmaların dışında etken tespitine yönelik az sayıda yapılan moleküler çalışmalar ve izolasyon çalışmaları da mevcuttur (Türütöğlü ve Erganiş, 1996; Güler ve ark, 2006; Kalender ve ark, 2013). Yapılan serolojik, moleküler ve kültürel çalışmalarla etkenin varlığı gösterilmiş ve hastalığın ülkemiz için yüksek risk potansiyeli taşıdığı konusunda bilgiler elde edilmiştir. Ancak çalışmalar büyük coğrafi alanları kapsamadığı için sınırlı kalmıştır. Ülkesel veya bölgesel anlamda bir değerlendirme yapma imkanı bulunmamaktadır.

Yurdumuzda yüksek seroprevalans değerlerinin görülmesi ve etkenin varlığının belirlenmesi, *C. abortus*'un Avrupa ülkeleri ve sınır komşumuz olan ülkelerde olduğu gibi Türkiye hayvancılığı için de önemli bir abort etkeni olabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla ülke veya bölge çapında abort materyallerinin *C. abortus* yönünden araştırılması gereklidir. Bu gereklilikten yola çıkarak; bu çalışmada, Marmara bölgesinde görülen ruminant abortlarında *C. abortus* varlığının araştırılarak bölgesel anlamda hastalıkla ilgili ilk epidemiyolojik verinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ülkemizde *C. abortus*'un genotiplendirilmesi ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmayla Türkiye'de görülen hastalık etkeni MLVA ile genotiplendirilerek bu anlamda ilk veri ortaya konmuştur.

Hastalığın teşhisinde farklı yöntemler kullanılmakla beraber, en güvenilir ve hızlı sonuçlar moleküler teşhis ile mümkündür. Bu amaçla en çok tercih edilen yöntemlerden biri Real Time PCR'dir (Sachse ve ark, 2009). İzolasyon, materyalin laboratuvara ulaştırılması sırasında özel besi yerlerine ihtiyaç duyulması, izolasyon şansının düşük olması ve etkenin zoonoz olması sebebiyle moleküler yöntemlere göre daha az tercih edilir (Ward, 2006). CFT testi *Chlamydiaceae* ailesinin ortak antijeni olan lipopolisakkaritleri tespit etmesinden dolayı tür spesifik sonuçlar vermez. ELISA testi de hastalık teşhisi amacıyla değil, tarama testi olarak faydalıdır (WEB_2, 2018). Bu çalışmada *C. abortus*'u tür spesifik olarak teşhis edebilen, aynı zamanda düşük tespit limitine sahip olan Real Time PCR yöntemi tercih edilmiştir. Yöntemin tespit limiti reaksiyon başına 2 ifu'dur. Yöntemin özgüllük ve duyarlılığı Klamidyal ve Klamidyal olmayan bakterilerle araştırılmış, *C. abortus* harici hiçbir mikroorganizmada tespit edilebilen bir PCR sinyali oluşturmamıştır (Pantchev ve ark, 2009). Yöntem OIE tarafından önerilen Real Time PCR yöntemlerinden biridir (WEB_2, 2018).

Çalışmada Marmara bölgesi genelinde 380 tanesi koyun, 70 tanesi keçi, 267 tanesi sığır, 13 tanesi mandaya ait abort materyallerinden sırasıyla 63 (%16.6), 15 (%21.4), 8 (%3.0) ve 1 (%7.7) pozitiflik, toplam 730 numunede 87 (%11.9) pozitiflik tespit edildi. Hayvan türlerine göre değerlendirildiğinde en yüksek pozitiflik oranı %21.4 ile keçilerde ve %16.6 ile koyunlarda saptandı.

Ülkemizde küçük rumimnantlarda daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde Türütoğlu ve Erganiş (1996) koyun abort vakalarından *C. abortus* izolasyonu yapmışlar ve materyalin %16.3'ünden *C. abortus* izole etmişlerdir. Bu oran çalışmadaki oranla benzerdir. Güler ve ark (2006) yaptıkları çalışmada koyunlara ait vaginal sıvı örneklerinden %7.45 oranında, Kalender ve ark (2013) Kuzey Anadolu Bölgesinde görülen koyun abortlarında %9.8 oranında Klamidyal DNA saptamışlardır. Çalışmamızdaki koyunlardaki pozitiflik oranları bu iki çalışmaya göre yüksektir. Farklılığın örnekleme yönteminden, kullanılan analiz metodundan ve bölgesel farklılıktan kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir.

Küçük ruminantlardaki pozitiflik oranları yurtdışındaki çalışmalarla kıyaslandığında; İsviçre'de koyun abortlarının %39.0, keçi abortlarının %23.0'ının *C. abortus* kaynaklı olduğu görülmüştür (Chanton-Greutmann ve ark, 2002). Bizim çalışmamızda keçilerde tespit edilen oran (%21.4) çok yakındır. Koyunlarda ise (%16.6) daha düşük bulunmuştur. Türkiye'nin sınır komşularından İran'da PCR metoduyla yapılan çalışmalarda koyun ve keçilerde değişen oranlarda pozitiflikler bulunmuştur. Barati ve ark (2017) 100 koyun abort örneğini incelemiş ve 26 (%26.0) tanesinde *C. abortus* varlığını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, koyun abort materyallerinde *C. abortus* %37.0 oranında pozitif olarak bulunmuştur (Ebadi ve ark, 2015). Yine İran'da yapılan diğer bir moleküler çalışmada koyun ve keçi abortlarında *C. abortus* oranı %11.0 olarak bildirilmiştir (Heidari ve ark, 2017). Bulgaristan'da 2013-2018 yılları arasında koyun ve keçilerde görülen abort vakaları *C. abortus* yönünden PCR ile araştırılmış ve %35.8 oranında pozitiflik bulunmuştur. Bu çalışmada koyun ve keçilerdeki ayrı ayrı pozitiflik oranları sırasıyla %41.9 ve %25.0'dir (Simeonov ve Chilingirova, 2018). Çalışmalarda değişen pozitiflikler belirlenmiş olmakla birlikte genellikle küçük ruminantlarda görülen abortlar içerisinde *C. abortus*'un yüksek öneme sahip olduğu görülmektedir. Bu yönüyle sonuçlar çalışmamız ile benzer bulunmuştur.

Çalışmamızda sığırlarda pozitiflik %3.0 oranında tespit edildiğinden tek bir manda örneğinde *C. abortus* DNA'sı tespit edildi. Sığır vakaları karşılaştırıldığında; Temur ve ark, (2007) Erzurum'da sığır abortlarından yumurta inokülasyonunu takiben modifiye Ziehl-Neelsen boyama metodu ile %5.5 oranında hastalık etkenini tespit etmişlerdir. Kılıç ve ark, (2010) ise sığır abortlarına ait 47 materyalden %6.3'ünde etken DNA'sını tespit etmişlerdir.

Aras ve ark (2017) Konya ve Aksaray'da görülen sığır abort vakalarından %3.0 oranında *C. abortus* pozitifliğini PCR yöntemiyle belirlemişlerdir. Çalışmamızda sığır abortlarında tespit edilen %3.0'lık pozitiflik oranı Türkiye'de sığırlarda etken tespitine yönelik yapılan çalışmalara paralel bulunmuştur. İsviçre'de 2003-2004 yıllarında görülen sığır abort vakalarında, bu çalışma sonuçlarına paralel bir şekilde, 235 örnekten 12 tanesinde (%5.1) *C. abortus* moleküler olarak tespit edilmiştir (Borel ve ark, 2006). Osman ve ark (2012) Mısır'da sığırlarda *Chlamydiaceae* varlığını araştırdıkları çalışmalarında toplam 73 sığır örneğinin %15.1' inde *C. abortus* DNA'sını tespit etmişlerdir. Bu oran çalışmamızdaki sığır pozitifliğine göre (%3.0) yüksek bulunmuştur.

Chlamydia türlerinin mandaları enfekte ettiği bilinmekle birlikte (Galiero, 2007; Burnard ve Polkinghorne, 2016) moleküler tespit ile ilgili yapılmış çalışmalar çok sınırlıdır. Greco ve ark, (2008) yaptıkları bir çalışmada abort oranı %36.8 çıkan bir sürüde etkeni nested PCR ile araştırmış ve 14 vaginal sıvıap örneğinin %21.4'ünden ve 7 fetusun %42.9'undan *Chlamydia* spp. tespiti yapmıştır. Fetüslardan iki örneğin *C. abortus* ve *C. pecorum* ile aynı anda, birinin sadece *C. abortus* ile enfekte olduğunu belirlemiştir. Mısır'da ise 102 manda örneğinde %9.8 oranında pozitif bulunmuştur (Osman ve ark, 2012) . Çalışmamızdaki manda sayısının (13) düşük olması, oransal olarak değerlendirme yapmayı mümkün kılmamaktadır. Ancak bu çalışma, ülkemizde ilk kez bir manda fetüsünde *C. abortus* tespit edilmiş olması açısından önem arz etmektedir.

Hastalıktan en fazla etkilenen türler olan küçük ruminantlardan koyun ve keçiler birlikte değerlendirildiğinde 450 materyalin %17.3'ünde (78 örnek) etken DNA'sı tespit edildi. Sığır ve mandalar birlikte değerlendirildiğinde pozitiflik yüzdesi %3.2 olarak bulundu. Bu oranlar tüm dünyada olduğu gibi Marmara Bölgesi'nde de hastalığın daha çok küçük ruminantlarda önemli olduğunu göstermektedir (Longbottom ve Coulter, 2003).

Çalışmada Real Time PCR sonuçları Marmara Bölgesi ele alınarak değerlendirildiğinde; İstanbul, Edirne, Kırklareli, Tekirdağ, Çanakkale, Kocaeli, Yalova, Bilecik, Bursa ve Balıkesir illerinde *C. abortus* pozitifliği tespit edildi. Yalnızca Sakarya ilinde pozitif örnek mevcut değildi. Ancak temin edilen materyal sayısının (18) az ve bunların da önemli kısmının (10) ise pozitiflik oranı düşük olan sığır numuneleri olması sebebiyle bulunan negatif sonucun yanıltıcı olabileceği değerlendirildi. İllerden elde edilen pozitif sonuçlar hastalığın Marmara Bölgesi genelinde yaygın olarak bulunduğunu ortaya koymuştur.

İllere göre materyal sayısı ile pozitiflik kıyaslandığında numune sayısı açısından yetersiz sayılabilecek İstanbul değerlendirme dışı bırakıldı ve en yüksek oranlar sırasıyla

Kırklareli ve Edirne’de tespit edildi. Kırklareli’den temin edilen 80 abort materyalinin %18.7’si, Edirne’den temin edilen 157 materyalin %13.4’ü pozitif olarak bulundu. Hastalıktan en fazla etkilenen küçük ruminantlardaki pozitiflikler ayrıca incelendiğinde en çok numune temini yapılan 5 ilden yine en yüksek pozitiflikler %25.4 ile Kırklareli ve %20.9 ile Edirne’de bulundu. Diğer illerde bulunan pozitiflik oranları Çanakkale’de %17.6, Balıkesir’de %15.4 ve Bursa’da %1.6’dır. İllere göre pozitiflik oranlarındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 11). Bu sonuç Marmara Bölgesi’nde hastalığın yoğun seyrettiği bir il olmadığını, tüm bölgenin hastalıktan etkilendiğini ve dolayısı ile de bir ilde hastalığın başka bir ile göre daha yoğun olmadığını göstermektedir.

Marmara Bölgesi’nde genotiplendirilen toplam 87 *C. abortus* DNA’sının %93.1’inin genotip 2 olduğu görülmüştür. Cezayir’de yapılan bir çalışmada 25 çiftlikten koyun ve keçilere ait 199 vaginal sıvaptan %6.5 *C. abortus* DNA’sı tespit edilmiş, yapılan MLVA ile tamamı genotip 2 olarak bulunmuştur (Merdja ve ark, 2015). Çin’de Tibet sığırı abort vakaları *C. abortus* yönünden araştırılmıştır. Dokuz sürüden 9 aborte fetüs ve 126 vaginal sıvap örneğinden %23.8 oranında etken tespit edilmiş ve bunların tamamının MLVA genotip 2 olduğu belirlenmiştir (Li ve ark, 2015). Fransa’da klinik örneklerden izole edilmiş 9 *C. abortus* suşunun %88.9’unun genotip 2 olduğu görülmüştür. Farklı olarak İngiltere’de şu ana kadar sadece genotip 4 ve genotip 5 tespit edilmiştir (Laroucau ve ark, 2009). Bu çalışmalar, dünyada genellikle hâkim genotipin genotip 2 olduğunu göstermektedir ve bu sonuçlar çalışmamızla da uyumludur. Ancak çalışmamızla ülkemizde genotip 3, 4 ve 5 genotiplerinin de enfeksiyonlarda rol aldığı görülmüştür. Bu yönüyle *C. abortus*’un ülkemizde genotipik çeşitliliğinin yüksek olduğu söylenebilir.

Hayvan türlerine göre genotipler incelendiğinde sığır, koyun ve keçilerde hâkim genotipin genotip 2 olduğu görülmektedir. 63 koyundan %95.2’si, 16 keçinin %100’ü, ve 8 sığır örneğinin %75.0’ı genotip 2 olarak bulundu. Mandalardan tespit edilmiş tek bir etken DNA’sı genotiplendirildiğinde genotip 3 olduğu görüldü. Sadece tek bir pozitif örnek olduğu için manda enfeksiyonlarında yaygın genotip ile ilgili bir değerlendirme yapılamadı. Ancak tek bir manda izolatının normalde yaygın olmayan genotip olan genotip 3 olarak bulunması ve başka hiçbir hayvan türünden genotip 3 tespit edilmemiş olması oldukça dikkat çekicidir. Manda izolatlarının MLVA ile genotiplendirmesinin yapıldığı başka bir çalışmaya rastlanmadığı için kıyaslama yapılamadı. Bir sığır örneği genotip 4 bir tanesi de genotip 5 olarak bulundu. Koyun ve keçi örneklerinden genotip 4 tespit edilmezken 3 koyun örneği genotip 5 olarak sınıflandırıldı. Bu yönüyle bakıldığında Marmara Bölgesi’nde genotip 3 ve 4 olarak bulunan suşlar yalnızca büyük ruminantlardan tespit edildi. Manda örneği

Düzce'den, sığır örneği ise Yalova'dan temin edildi. Daha önce yapılan çalışmada genotip 4 olarak tespit edilen suşların İngiltere, Almanya ve Yunanistan'da izole edilmiş oldukları görölmektedir. Genotip 5 olarak sınıflandırılan suşlar Çanakkale ve Kırklareli'den birer koyun ve Balıkesir'den bir sığıra aittir. Genotip 5 daha önce Almanya, İngiltere ve Yunanistan'da tespit edilmiştir. Tüm dünyadan ayrışan, Yunanistan varyant suşlarının (LLG, POS) ait olduğu genotip 6 (Laroucau ve ark, 2009) Marmara Bölgesi'nde tespit edilmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde enzootik abort ile ilgili bugüne kadar büyük çapta araştırmalar yapılmamış, bunun sonucu olarak da hastalığın önemi yeterince anlaşılamamıştır. Bu çalışma ile hastalığın Marmara Bölgesi genelinde ruminant abortları açısından yeri, özgüllük ve duyarlılığı yüksek bir test olan Real Time PCR ile ortaya konmuş ve özellikle küçük ruminantlarda hastalığın yaygın olarak görüldüğü ve abortların önemli bir kısmından sorumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bu çalışma ile Marmara Bölgesi'nde görülen abortlarda *C. abortus*'un MLVA genotipleri ülkemizde ilk kez belirlenerek etkenin genotip çeşitliliği ile ilgili ilk epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Dünya'da yapılan çalışmalara paralel olarak hâkim genotip genotip 2 olarak bulunmakla birlikte, genotip 3, 4 ve 5'in varlığı da ortaya konulmuştur. Bu açıdan düşünüldüğünde Marmara Bölgesi'nde *C. abortus*'un genotipik çeşitliliğinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma ile yurdumuzda ilk kez mandadan *C. abortus* tespiti yapılmıştır. Ayrıca dünyada ilk kez bir manda abortundan sorumlu *C. abortus* etkeni MLVA ile genotiplendirilmiştir.

Çalışma sonuçlarının ışığında öneriler aşağıda sıralanmıştır:

1- Hastalık küçük ruminantlarda Marmara Bölgesi genelinde yaygın olarak görülmektedir. Yurdumuzun diğer bölgelerinde veya ülke genelinde hastalık etkenini belirlemeye yönelik çalışmalar yapılması ulusal anlamda hastalığın epidemiyolojisini anlamak açısından faydalı olacaktır.

2- Hastalıkla mücadelede en önemli nokta enfeksiyonun sağlıklı hayvanlara bulaşmasını sınırlandırmaktır. Bu amaçla iyi bir sürü yönetimi gereklidir (Stuen ve Longbottom, 2011). Hastalıkla ilgili ulusal kontrol stratejisi hazırlanmalıdır. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın hayvan hastalıkları ile mücadele ve hayvan hareketleri kontrolü programında enzootik abort hastalığının da yer alması hastalığın sınırlandırılması ve kontrolü için önemlidir. Hastalıkla mücadele için oluşturulacak stratejinin temelinde öncelikli olarak aşılanmanın değerlendirilmesi gerekir. Dünyada en yaygın olarak kullanılan aşı canlı aşıdır. Ancak kullanılan aşının enfeksiyona yol açtığı gösterilmiş olsa da hastalığın kontrolünde en etkili yöntem olduğu da bilinmektedir (Stuen ve Longbottom, 2011). Aşı kaynaklı enfeksiyonların moleküler yöntemlerle doğal enfeksiyondan ayırt edilebildiği için (Laroucau ve ark, 2010) aşının ülkesel çapta sağlayacağı fayda- zarar analizi yapılabilir.

Ayrıca vaka bazında abort görülen sürülerde enfeksiyonun yaygınlığının ve hastalık kaynağının belirlenmesi gibi epidemiyolojik çalışmalar lokal olarak hastalıkla mücadeleyi kolaylaştırabilir.

Hastalıkla mücadeleyi zorlaştıran en önemli etkenlerden birisi ortak meralardır. Merada abort yapan bir hayvan hastalıktan arı sürüleri bu yolla enfekte edebilir. Bu amaçla iyi bir mera yönetimi uygulanmalıdır.

Hastalığın yayılımında hayvan hareketlerinin önemi büyüktür. *C. abortus* için hayvan hareketlerini sınırlayan bir yasal mevzuat bulunmamaktadır. Damızlık hayvan hareketlerinde ve ithalatında hayvanların *C. abortus*'dan arılığının serolojik ve moleküler yöntemlerle aranması hastalığı sınırlamada büyük yarar sağlayacaktır.

3- Hastalık halk sağlığı açısından da önemlidir. Dünyada *C. abortus* kaynaklı insan abort vakaları bildirilmiştir (Pospischil, 2002; Walder ve ark, 2005; Pichon ve ark, 2020). Ancak Türkiye'de insanlarda yapılan çalışmalarda genellikle *C. trachomatis* varlığı araştırılmış olmakla birlikte (Kömeç, 2013; Özbek ve ark, 2008; Altunsu 2013; Albayrak 2013; Kutluca 2016), *C. abortus*'un durumuyla ilgili bir veriye rastlanmamıştır. Marmara Bölgesi'nde hastalığın yaygınlığı düşünüldüğünde insan abort vakalarının bir kısmının *C. abortus* kaynaklı olabileceği düşünülebilir. Bu sebeple Marmara Bölgesi'nde küçük ruminant teması olan ve düşük yapan kadınlarda *C. abortus* araştırması da yapılmalıdır. Bu konuda tek sağlık anlayışı ile beşeri hekimlikle birlikte yapılacak ortak çalışmalar faydalı olacaktır.

4- Enfeksiyon yönünden en riskli durumda olan hayvan yetiştiricilerine hastalıkla ilgili dökümanlar hazırlanması, eğitim verilmesi gibi uygulamalar farkındalığın artırılması açısından faydalı olacaktır.

5- Marmara Bölgesi'nde *C. abortus*'un genotiplendirilmesi ile bu konuda ulusal ilk epidemiyolojik veri sağlanmıştır. Yapılacak benzer çalışmalar etkenin yurdumuzdaki tüm genotipleriyle birlikte ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır.

6- Çalışmada 87 pozitif materyal içerisinde genotip 3 olan tek örnek, sadece tek pozitif tespiti yapılan mandaya ait olması, yani mandalarda tespit edilen hastalık etkeninin diğer hayvan türlerinden farklı bir genotipte bulunması ilgi çekici bir araştırma konusu olabilir. Daha çok manda örneği ile benzer çalışmaların yapılması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

Aitken ID. Diseases of Sheep (4th ed), Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK, 2007, p.105-112.

Aiello SE, Mays A. The Merck Veterinary Manual. Merck & Co., INC. Whitehouse Station, New Jersey, U.S.A, 1998.

Aiello SE, Mays A. Merck Veterinary Manual (9th ed). Reproductive System - Abortion İn Sheep - Eae. 2005, Merck & Co., Inc. USA.

Albayrak T. İnfertil kadınlarda Chlamydia antikorlarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep, 2013, 84.

Al-Dabagh II, Jasim BM, Jarjees MT. Seroprevalence of antibodies to toxoplasmosis, brucellosis and chlamydiosis in abortive sheep in Nineveh governorate, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 2014, 28, 1, 21-25.

Al-Qudah KM, Sharif LA, Raouf RY, Hailat NQ, Aldomy FM. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydomphila abortus* shown in Awassi Sheep and local goats in Jordan. *Veterinary Medicine* 2004, 49, 460- 466.

Altunsu AT. Endoservisitli ve normal kadınlarda servikal sürüntü ve ilk akım idrar örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu ile *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* sıklığının araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2013, 43.

Aras Z, Sayın Z, Gölen G. Sığır abortlarında *Chlamydomphila abortus* varlığının PCR ile araştırılması. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 2017, 33(2), 77-80.

Ataman B, Hakioglu F. Eskişehir bölgesinde enzootik koyun virüsü abortusu bakımından araştırmalar. *Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 1955, 110-111.

- Barati S , Moori-Bakhtiari N, Najafabadi MG , Momtaz H, Shokuhizadeh L.** The role of zoonotic chlamydial agents in ruminants abortion. *Iranian Journal of Microbiology* 2017, 288-294.
- Bedson SP, Western GT, Simpson SL.** Observations on the aetiology of psittacosis. *Clinical and Laboratory Notes*, 1930, 235–236.
- Bisias G, Burriel AR, Boutsini S, Kritas S, Leontides LS.** A serological investigation of some abortion causes among small ruminant flocks in Greece. *The Internet Journal of Veterinary Medicine* 2010, 8(2), DOI: 10.5580/28f4.
- Borel N.** Chlamydial abortion in ruminants. Serological, epidemiological and diagnostic investigations, Zurich, University of Zurich, Vetsuisse Faculty, 2008.
- 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.
- Borel N, Thoma R, Spaeni P.** Chlamydia-related abortions in Cattle from Graubunden, Switzerland. *Veterinary Pathology* 2006, 43, 702–708.
- Borel N, Kempf E, Hotzel H, Schubert E, Torgerson P, Slickers P, Ehricht R, Tasara T, Pospischil A, Sachse K.** Direct identification of Chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay – a validation study. *Molecular and Cellular Probes* 2008, 22, 55–64.
- Burnard D, Polkinghorne A.** Chlamydial infections in wildlife–conservation threats and/or reservoirs of ‘spill-over’ infections?. *Veterinary Microbiology* 2016, 196, 78-84.
- Bush RM, Everett KDE.** Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001, 51, 203–220.
- Buxton D, Barlow R, Finlayson J, Anderson I, Mackeller I.** Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* Infection of pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology* 1990, 102, 221-237.
- Buxton D, Anderson IE, Longbottom D, Livingstone M, Wattedegera S, Entrican G.** Ovine *Chlamydia* abortion: Characterization of the inflammatory immune response in placenta tissues. *Journal of Comparative Pathology* 2002, 127, 133-141.

Büyüköztürk Ş, Çokluk Ö, Köklü N. Sosyal Bilimler İçin İstatistik (22. Baskı). Pegem Yayınları, Ankara, 2012, 280.

Carter GR, Wise DJ. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology (6th ed), Michigan State University Press, East Lansing, Michigan, 2004, 290.

Chalmers WS, Simpson J, Lee SJ, Baxendale W. Use of a live Chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Veterinary Record* 1997, 141(3), 63-67.

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.

Campos-Hernández E, Vázquez-Chagoyán J.C, Salem A.Z.M, Saltijeral-Oaxaca J.A, Escalante-Ochoa C, López-Heydeck S.M, Oca-Jiménez R.M. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical Animal Health and Production* 2014, 46 (6), 919–924.

Coulon C, Eterpi M, Greub G, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. Amoebal host range, host-free survival and disinfection susceptibility of environmental *chlamydiae* as compared to *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2012, 64(3), 364-373.

Çaya H, Aslantaş Ö, İyisan AS, Mirioğlu M, Tunca Ş.T. Investigation of antibodies against *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) using microcomplement fixation test (mCFT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2006, 17, 7-10.

Dawson M. Chlamydia, In: Laing JA, Brinley Morgan WJ, Wagner WC. Fertility and Infertility in Veterinary Practice, The University printing House, Oxford, 1988, 280.

Duman R, Durak Y. Konya yöresindeki koyunlarda atıklara neden olan *Chlamydia psittaci* infeksiyonlarının komplement fikzasyon testi ile araştırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 1998, 22, 511–515.

Durand NJ, Nicolas J, Favre M. Lymphogranulomatose inguinale subaiguë d'origine génitale probable, peut-être vénérienne. *Bulletin de la Société des Médecins des Hôpitaux de*

Paris 1913, 35, 274–288.

Ebadi A, Moosakhani F, Jamshidian M. Phylogenetic Analysis of *Chlamydia abortus* Isolated from fetus aborted ewes of Alborz Province. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 2015, 4, 122-126.

Esmaeili, H, Bolourchi, M, Mokhber-Dezfouli MR. Seroprevalence of *Chlamydia abortus* infection in sheep and goats in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 2015, 9(2), 73-77.

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.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 2006, 19, 165-256.

Everett KDE. Chlamydiae and Chlamydiales: More Than Meets the Eye. *Veterinary Microbiology* 2000, 75, 109-126.

Everett KDE, Hatch TP. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *Journal of Bacteriology* 1995, 177, 877-882.

Everett KDE, Andersen AA. Identification of nine species of the *Chlamydiaceae* using PCR RFLP. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999, 49, 803-813.

Fahad OA, Salman SS. Survey for ovine and caprine chlamydiosis by ELISA in AL-Fallujah city/Iraq. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2017; 5(6), 322-326.

Galiero G. Causes of infectious abortion in the Mediterranean buffalo. *Italian Journal of Animal Science* 2007, 6:sup2, 194-199.

García F, Gutiérrez-Martín CB, Ortega N, Rodríguez-Ferri EF, del Río ML, González OR, Salinas J. Efficacy of different commercial and new inactivated vaccines against ovine enzootic abortion. *Veterinary Microbiology* 2004, 100(1-2), 65-76.

Gerber A, Thoma R, Vretou E, Psarrou E, Kaiser C, Doherr MG, Zimmermann DR, Polkinghorne A, Pospischil A, Borel N. Ovine enzootic abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over a two year period. *BMC Veterinary Research* 2007, 3, 24.

Givens MD, Marely MSD. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 2008, 10, 10-16.

Gökçe HI, Kacar C, Genç O, Sözmen M. Seroprevalence of *Chlamydomphila 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.

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.

Greco G, Corrente M, Buonavoglia D, Campanile G, Di Palo R, Martella V, Bellacicco AL, D'Abramo M, Buonavoglia C. Epizootic abortion related to infections by *Chlamydomphila abortus* and *Chlamydomphila pecorum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 2008, 69 (9), 1061-1069.

Halberstaedter L, Prowazek SV. Zur atologie des trachoms. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1907, 33, 1285–1287.

Heidari S, Derakhshandeh A, Firouzi R, Ansari-Lari M, Masoudian M, Eraghi V. Molecular detection of *Chlamydomphila abortus*, *Coxiella burnetii*, and *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants' aborted fetuses in southern Iran. *Tropical Animal Health and Production* 2017, 50(4), 779–785.

Hu S-F, Li F, Zheng W-B, Liu G-H. Seroprevalence and risk factors of *Chlamydia abortus* infection in goats in Hunan Province, Subtropical China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2018, 18-9.

Jorgensen DM. Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. *Emerging Infectious Diseases* 1997, 3, 91-194.

Kadra B, Balla É. Development and production of vaccines against abortion caused by *Chlamydomphila abortus* and *Coxiella burnetti* in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2006, 62, 75-78.

Kalender H, Kılıç A, Eröksüz H, Muz A, Kılınc Ü, Taşdemir B. Identification of *Chlamydomphila abortus* infection in aborting ewes and goats in Eastern Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2013, 164 (6), 295-301.

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.

Kılıç K, Kalender H, Muz A. Atık sığır fetuslarında *Chlamydomphila abortus*'un mikrobiyolojik kültür ve PCR ile saptanması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2010, 24(3), 129-132.

Kömeç S. Gebe kadınlarda klamidya enfeksiyonu seroprevalansı, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 2013, 50.

Kutluca H. Cumhuriyet üniversitesi uygulama ve araştırma hastanesi'ne başvuran hastalarda *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* bakterilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Sivas, 2016, 77.

Küçükayan U, Dakman A, Ülker U, Müştak K. Koyun kan serumları ve fetuslarının bakteriyel atık etkenleri yönünden incelenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2007, 18 (1-2), 11-16.

Lampe M, Suchland R, Stamm W. Nucleotide sequence of the variable domains within the major outer membrane protein gene from serovariants of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* 1993, 61, 213–219.

Laroucau K, Souriau A, Rodolakis A. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydomphila* using *pmp* genes. *Veterinary Microbiology* 2001, 82, 155–164.

Laroucau K, Vorimore F, Bertin C, Mohamad KY, Thierry S, Hermann W, Maingourd C, Pourcel C, Longbottom D, Magnino S, Sachse K, Vretou E, Rodolakis A. Genotyping

of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Veterinary Microbiology* 2009, 137, 335–344.

Laroucau K, Vorimore F, Sachse K, Vretou E, Siarkou VI, Willems H, Magnino S, Rodolakis A, Bavoil PM. Differential identification of *Chlamydophila abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine* 2010, 28, 5653–5656.

Laroucau K, Vorimore F, Aaziz A, Solmonson L, Hsia C, Bavoil P, Fach P, Hölzer M, Wuenschmann A, Sachse K. *Chlamydia buteonis*, a new *Chlamydia* species isolated from a red-shouldered hawk. *Systematic and Applied Microbiology* 2019, 42(5).

Li Z, Cao X, Fu B, Chao Y, Cai J, Zhou J. Identification and Characterization of *Chlamydia abortus* Isolates from Yaks in Qinghai, China. *Hindawi BioMed Research International* 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/658519>.

Li Z, Liu P, Cao X, Lou Z, Zarwba-Marchewka K, Szymańska-Czerwińska M, Niemczuk K, Hu B, Bai X, Zhou J. First Report of *Chlamydia abortus* in farmed fur animals. *Hindawi BioMed Research International* 2018, <https://doi.org/10.1155/2018/4289648>.

Lindner K. Zur aetiologie der gonokokken-freien urethritis. *Wien. Klin Wochenschr* 1910, 8, 283–284.

Litwin J. The Growth Cycle of the Psittacosis Group of Organisms. *Journal of Infectious Diseases* 1959, 109, 129-160.

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.

Longbottom D, Russell M, Dunbar SM, Jones GE, Herring AJ. Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in sheep. *Infection and Immunity* 1998, 66 (4), 1317-1324.

Longbottom D, Fairley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a

recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydomphila abortus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40, 4235–4243.

Longbottom D, Coulter L. Animal Chlamydiosis and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology* 2003, 128, 217-44.

Longbottom D, Livingstone M, Maley S, Zon A, Rocchi M, Wilson K, Wheelhouse N, Dagleish M, Aitchison K, Wattedegedera S, Nath M, Entrican G, Buxton D. Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep. *Plos One* 2013, 8 (2), e57950.

Longbottom D, Sait M, Livingstone M, Laroucau K, Sachse K, Harris SR, Thomson NR, H, Seth-Smith H. Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine* 2018, 36, 3593–3598.

Lozano EA. Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididymitis. *American Journal of Veterinary Research* 1986, 47, 1153-1156.

Lund PA. Microbial Molecular Chaperones. *Advances in Microbial Physiology* 2001, 44, 93-140.

Manasrah MYI. *Chlamydomphila 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.

Merdja S-E, Khaled H, Aaziz R, Vorimore F, Bertin C, Dahmani A, Bouyoucef A, Laroucau K. Detection and genotyping of Chlamydia species responsible for reproductive disorders in Algerian small ruminants. *Tropical Animal Health Production* 2015, 47 (2), 437-43.

Moulder JW. The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. *Annual Review of Microbiology* 1966, 20, 107–130.

Moulder JW. Interaction of Chlamydiae and host cells *in vitro*. *Review of Microbiology* 1991, 55, 143-190.

Miyagawa Y, Mitamura T, Yaoi H, Ishii N, Okanishi J. Fourth report: studies on the virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas, Favre and Durand. Cultivation of the virus on the chorioallantoic membrane of the chicken embryo. *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 1935, 13, 733–738.

Nunes A, Gomes JP. Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 23, 49-65.

Omsland A, 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 of the United States of America* 2012, 109, 19781–19785.

Osman KM, Ali HA, ElJakee JA, Galal HM. *Chlamydiaceae* in riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) and cows (*Bos taurus*) in Egypt with and without signs of reproductive disease. *New Zealand Veterinary Journal* 2012, 60 (4), 228-233.

Otlu S, Şahin M, Unver A, Çelebi Ö. Detection of *Brucella melitensis* and *Chlamydomphila abortus* antibodies in aborting sheep in the kars province of Turkey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2007, 51, 493-495.

Özbek A, Özbek E, Kalkan Y, Temur A, Küçükalek ÖF. *Chlamydia trachomatis*'in insan biyotipleri sığırlarda düşük etkeni olabilir mi? yeni bir konak-patojen ilişkisini araştıran immünohistokimyasal çalışma. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2008, 42, 599-605.

Öztürk D, Türütoğlu H , Kaya M. Burdur ilindeki koyunlarda *Chlamydomphila abortus* enfeksiyonunun seroprevalansı. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016, 1 (2), 17-20.

Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydomphila psittaci* and *Chlamydomphila abortus* from tissue samples. *The Veterinary Journal* 2009, 181, 145, 150.

Peeling RW, Mabey DC. Heat shock protein expression and immunity in chlamydial infections. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 1999, 7, 72-79.

Pichon N, Guindre L, Laroucau K, Cantaloube M, Nallatamby A, Parreau S. (2020). *Chlamydia abortus* in Pregnant Woman with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Emerging Infectious Diseases* 2020, 26(3), 628–629.

Plommet M, Bosseray N, Lantier F, Bernard F, Pardon P, Rodolakis A. Simultaneous vaccination by three living attenuated strains of Brucella, Salmonella and *Chlamydia* in mice. *Vaccine* 1987, 5(1), 27-32.

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, 64-66.

Rake G, Jones HP. Studies on lymphogranuloma venereum: I. development of the agent in the yolk sac of the chicken embryo. *The Journal of Experimental Medicine* 1942, 75, 323–338.

Raulston JE. Chlamydial envelope components and pathogen host cell interactions. *Molecular Microbiology* 1995, 15, 607.

Rekiki A, Sidi-Boumedineb K, Souriaub A, Jemlia J, Hammamia S, Rodolakis A. Isolation and characterisation of local strains of *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) from Tunisia. *Veterinary Research* 2002, 33, 215-222.

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.

Rodolakis A. Caprine Chlamydiosis: in Recent Advances in Goats Diseases. Edited by Tempesta M. *International Veterinary Information Service* 2001.

Rodolakis A, Souriau A. Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* (var. ovis) obtained by NTG mutagenesis. *Annales de Recherches Veterinaires* 1983, 14, 155–61.

Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A. & Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology* 2009, 135, 2–21.

Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy H, Weidmann M, Myers G, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Liebler-Tenorio E, Ruettger A, Bavoil P.M, Hufert F.T, Rosselló-Móra R, Marz M. 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.

Salti-Montesanto V, Tsoli E, Papavassiliou P, Psarrou E, Markey BM, Jones GE, Vretou E. Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *American Journal of Veterinary Research* 1997, 58, 228–235.

Samkange A. Seroprevalence survey of *Chlamydophila abortus* infection in breeding goats on commercial farms in northern Namibia. Doktora tezi, University of Pretoria etd, South Africa, 2008, 52.

Sargison ND, Truylers IGR, Howie FE, Thomson JR, Cox AL, Livingstone M, Longbottom D. Identification of the 1B vaccine strain of *Chlamydia abortus* in aborted placentas during the investigation of toxæmic and systemic disease in sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 2015, 63(5), 284-287.

Schachter J, Stephens RS, Timms P, Kuo C, Bavoil PM, Birkelund S, Boman J, Caldwell H, Campbell LA, Chernesky M, Christiansen G, Clarke IN, Gaydos C, Grayston JT, Hackstadt T, Hsia R, Kaltenboeck B, Leinonen M, Ojcius D, McClarty G, Orfila J, Peeling R, Puolakkainen M, Quinn TC, Rank RG, Raulston J, Ridgeway GL, Saikku P, Stamm WE, Taylor-Robinson DT, Wang SP, Wyrick PB. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001, 51 (249), 243–251.

Siarkou V, Lambropoulos AF, Chrisafi S, Kotsis A, Papadopoulos O. Subspecies variation in Greek strains of *Chlamydophila abortus*. *Veterinary Microbiology* 2002, 85, 145-157.

Siarkou V, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Rodolakis A, Pannekoek Y, Sachse K, Longbottom D, Laroucau K. Diversification and Distribution of Ruminant *Chlamydia abortus* Clones Assessed by MLST and MLVA. *Plos One* 2015, 10 (5), e0126433.

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.

Smith A, Bradley KK, Stobierski MG, Tengelsen LA. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds, 2005. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2005, 226(4), 532-539.

Souriau A, Bosseray N, Rodolakis A, Lantier F, Plommet M. Anti-chlamydial immunity in ewes conferred by vaccination with a combination of three live chlamydia, brucella and salmonella vaccines. *Veterinary Record* 1988, 123(1), 12, 29-32.

Staub E, Marti H, Biondi R, Levi A, Donati M, Leonard CA, Ley SD, Pillonel T, Greub G, Seth-Smith HMB, Borel N. Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin. *Scientific Reports* 2018, 8, 5660.

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.

Storz J. Antigenic structures and interrelations of pl agents as associated with polyarthritis, enzootic abortion, intrauterine and latent intestinal infections. *Journal of Comparative Pathology* 1966, 76, 351-362.

Stuart ES, Troidle KM, MacDonald AB. Chlamydial Glycolipid Antigen: Extracellular Accumulation, Biological Activity, and Antibody Recognition. *Current Microbiology* 1994, 28, 85-90.

Stuen S, Longbottom D. Treatment and control of chlamydial and rickettsial infections in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2011, 27, 213-233.

Szeredi L, Bacsadi À. Detection of *Chlamydophila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method. *Journal of Comparative Pathology* 2002, 127, 257-263.

T'ang FF, Chang HL, Huang YT, Wang KC. Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Chinese Medical Journal* 1957, 75, 429–447.

Taylor-Brown A, Bachmann NL, Borel N, Polkinghorne A. Culture-independent genomic characterisation of Candidatus *Chlamydia sanzinia*, a novel uncultivated bacterium infecting snakes. *BMC Genomics* 2016, 17, 710.

Teankum K, Pospischil A, Jannet F, Brugnera E, Hoelzle LE, Hoelzle K, Weilenmann R, Zimmermann DR, Gerber A, Polkinghorne A, Borel N. Prevalence of *Chlamydiae* in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology* 2007, 67, 303-310.

Temur A, Dinler U, Seyitoğlu Ş, Kılınç Ü, Yalçın E. Analysis of Chlamydial abortus of cattle reared in Erzurum and surrounding provinces through bacteriological, histopathologic methods. Agris, FAO, 2007, Erişim tarihi: 23.12.2019.

Türütoğlu H, Erganiş O. Studies on isolation of *Chlamydia psittaci* caused to abortion in Ewes. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 1996, 27, 55-78.

Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) analysis. *Molecular Identification Systematics and Population Structure of Prokaryotes* 2006, 83-104.

Vorimore F, Hsia RC, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A, Sachse K, Bavoil P, Myers G, Laroucau K. Isolation of a New Chlamydia species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *Plos One* 2013, 8, e74823.

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.

Wang FI, Shieh H, Liao YK. Prevalance of *Chlamydophila abortus* infection in domesticated ruminants in Tiwan. *Veterinary Medical Science* 2001, 63, 1215-1220.

Ward M. The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica* 2006, 103, 769–796.

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.

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, 24.09.2019.


WEB_3. (2020). Tarım ve Orman Bakanlığı internet sitesi. <https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>, (15.03.2020).

Wheelhouse N., Aitchison K., Laroucau K., Thomson J. & Longbottom D. Evidence of *Chlamydophila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine* 2010, 28 (35), 5657–5663.

Yılmaz S. Bandırma Merinos Çiftliği ile Tahirova Türk-Alman örnek çiftlikleri koyunlarında tespit edilen virüsü abort vakaları. *Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi* 1962, 1, 6, 460-470.

EKLER

Ek 1



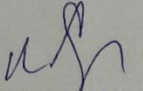
T.C.
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
PENDİK VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURULU

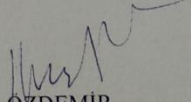
Sayı:187
Karar No:07/2018
Başvuru Tarihi: 03.04.2018


06.04.2018

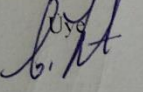
Sayın M. Engin MALAL

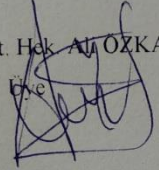
Sorumluluğunu üstlendiğiniz “Marmara bölgesinde görülen ruminant abortlarında *Chlamydia abortus*'un Real Time PCR ile teşhisi ve Multilokus VNTR analizi ile Genotiplendirilmesi” isimli çalışmanız kurumumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul kapsamı dışında olduğundan Etik Kurul kararına gerek olmadığı kararı verilmiştir.

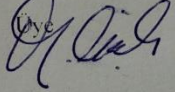

Dr. Rüçhan ALP
PEVHADYEK Başkanı

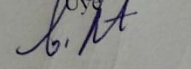

Dr. Ümit ÖZDEMİR
Başkan Yardımcısı

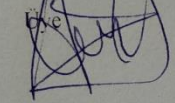

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU
Üye

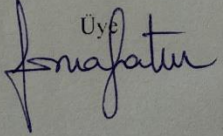

Gülseren YILDIZ ÖZ
Üye

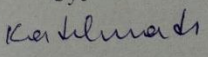

Uzm. Vet. Hek. Ali ÖZKARA
Üye


Vet. Hek. Ahmet ŞİMŞEK
Üye


Dr. Canan ALTINEL
Üye
Kartelenmiştir


Vet. Hek. M. Engin MALAL
Üye
Kartelenmiştir


Dr. Esra SATIR
Üye


Dr. Ankan GÜREL
Üye
Kartelenmiştir

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : MALAL Mehmet Engin
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : İzmir / 13.09.1986
E-mail : engin_malal@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2020
Lisans	Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2009

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2011-Halen	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü	Veteriner Hekim
2010-2011	Türk Silahlı Kuvvetleri	Gıda Kontrol Subayı

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Arslan S, Öncel T, Malal ME, Satır E, Sait A, Baca A, Aydoğan D. Bacteriological, virological and parasitological etiology in diarrhea cases determined p-mortem lambs and kids in Marmara Region. *Van Veterinary Journal*, 2016, 27(3) 147-152.

Karagül MS, Malal ME, Akar K. Investigation of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* antibodies in sheep in Düzce region. *Düzce Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2019, 9(3), 106-109.

Karagül MS, Malal ME, Akar K. Seroprevalence of Q fever in sheep and goats from the Marmara region, Turkey. *Journal of Veterinary Research*, 2019, 63, 527-532.

2. PROJELER

Tagem Projesi: *Salmonella* Abortus ovis ve *Campylobacter* sp. kaynaklı koyun atıkları ile *E. coli* ve *C. perfringens* Tip C ve D den kaynaklanan kuzu ölümleri için kombine aşı geliştirme çalışması (Devam Ediyor).

Tagem Projesi: İnfeksiyöz Karakterli Erken Dönem Buzağı Ölümlerine Karşı Kombine Aşı Geliştirilmesi (Devam Ediyor).

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Göktuna PT, Balcı GN, Uzun EA, Arslan A, Taşçene N, Gündüzalp C, Malal ME, Çökülgen T, Sareyüpoğlu B, Ateşoğlu A, Gülyaz V. Gebe Sığırlarda Şap ve *Escherichia coli* Aşılarının Simultane Uygulanmasının A/ASIA/G-VII Aşı Suşu Antikor Düzeyine Etkisi. *2. Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresi 2018, Antalya* (Sözlü Bildiri).

Malal ME, Ateşoğlu A, Satır E, Sayı O. Listeriosis cases diagnosed in Pendik Veterinary Control Institute, according to the months and animal species, between 2010-2014. 32. *Dünya Veteriner Hekimler Kongresi* 2015, İstanbul (Poster).

Arslan S, Oncel T, Malal ME, Satır E, Sait A, Baca A, Aydoğan D. Evaluation cases of young ruminants with diarrhea symptoms in Marmara region of Turkey. 32. *Dünya Veteriner Hekimler Kongresi* 2015, İstanbul (Poster).

Malal ME, Ateşoğlu A, Satır E, Sayı O. Bacterial and viral agents which are identified from aborted materials in PVKE between 2010-2014. 32. *Dünya Veteriner Hekimler Kongresi* 2015, İstanbul (Poster).

Satır E, Malal ME, Ateşoğlu A. 2009-2013 yılları arasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne gelen şüpheli arı, bal, petek numunelerinin Amerikan Yavru Çürüklüğü yönünden değerlendirilmesi. 4. *Uluslararası Muđla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi*. 2014. Muđla (Poster).

Satır E, Ateşoğlu A, Malal ME, Sayı O, Şimşek MG. Evolution of American Foulbrood disease in honeybees in Marmara region of Turkey between 2012-2016. 45. *Apimondia Kongresi* 2017. İstanbul (Poster).