

CHLAMYDIA TRACHOMATIS'İN İNSAN BİYOTİPLERİ SIĞIRLARDA DÜŞÜK ETKENİ OLABİLİR Mİ? YENİ BİR KONAK-PATOJEN İLİŞKİSİNİ ARAŞTIRAN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA*

CAN *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* HUMAN BIOVARS CAUSE
ABORTION IN CATTLE? AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY
ON A NEW HOST-PATHOGEN RELATIONSHIP

Ahmet ÖZBEK¹, Elvan ÖZBEK², Yıldırım KALKAN³, Ahmet TEMUR³,
Ömer Faruk KÜÇÜKKALEM³

¹ Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
(ahmetozbek1965@yahoo.com)

² Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

³ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Erzurum.

ÖZET

Zorunlu hücre içi bakteriyel patojenler olan klamidyalara, evrimsel gelişimleri sırasında tek hücreli ökaryotik canlılardan çok hücreli ökaryotik canlılara doğru yayılım göstermiştir. Bu grubun en önemli türü olan *Chlamydia trachomatis*, evrimsel gelişim sonucunda üç biyotipe ayrılmış ve bunlardan iki tanesi (Trachoma ve LGV) sadece insanlar için patojen hale gelmiştir. Başlangıçta klamidyalara yüksek konak özgüllüğü gösterdiği düşünülmüş ve bu durum zaman içerisinde gelişen konak-parazit arasındaki uyumla açıklanmıştır. Ancak bazı araştırmalar, bu bakterilerin laboratuvar hayvanlarında, embriyonlu yumurtada ve in vitro hücre kültürlerinde de üreyebildiğini göstermiştir. Bu çalışmada, insanlar için özgün enfeksiyon etkeni olan *C.trachomatis*'in atık sığır fetuslarında olası enfeksiyon etkeni olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 90 adet atık sığır fetusu alınmış ve öncelikle düşük etkeni olabilecek diğer bakterilerin varlığı geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerle araştırılmıştır. Bu yöntemlerle herhangi bir bakteriyel etkenin saptanmadığı 23 (%25.6) örnek klamidya varlığı yönünden incelenmiştir. Bu amaçla, doku örnekleri embriyonlu yumurta sarı kesesine ekilmiş ve ilk 24 saatten sonra ölen embriyonların sarı kese membranından sürme preparatlar hazırlanarak Giemsa boyama ile inklüzyonlar yönünden değerlendirilmiştir. Bu 23 örnekte *C.trachomatis*'e özgül antijen ve glikojen inklüzyonlarının varlığı, parafine gömülen fetal doku kesitlerinin sırasıyla immünohistokimyasal ve lugol (iyot) boyama yöntemleri ile incelenmesiyle araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal yöntem, *C.trachomatis* majör dış membran proteinlerine özgül işaretli antikorlar kullanılarak immünoperoksidaz boyama ile gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, değerlendirilen 23 örneğin beş tanesinde (%21.7) her üç yöntemle de (Giemsa, immünoperoksidaz ve lugol boya-

* Bu çalışma, Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Laboratuvarlarında yürütülmüş olup, kısmen Atatürk Üniversitesi Rektörlüğünün bilimsel araştırma projeleri fonu (No: 2005/183 ve 2005/184) ile desteklenmiştir. Çalışmanın bir bölümü, I. Ulusal Zoonoz Kongresi'nde (3-6 Aralık 2007, Erzurum) poster olarak sunulmuştur.

ma) *C.trachomatis* pozitifliği saptanmıştır. Çalışmamızın bulguları, *C.trachomatis*'in insandan başka yeni konak türlerine uyum kazanabileceğini düşündürmekle birlikte, konu ile ilgili daha ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır. Bulgularımız ayrıca, *C.trachomatis* enfeksiyonlarının bulaşında olası yeni enfeksiyon kaynaklarının düşünülmesi gerektiğini de gündeme getirmektedir.

Anahtar sözcükler: *Chlamydia trachomatis*, konak özgüllüğü, immünoperoksidaz boyama, lugol boyama, atık siğir fetusu.

ABSTRACT

Chlamydiae, which are obligate intracellular bacterial pathogens, have been radiated from single-celled eukaryotes into multi-celled hosts during their evolution. *Chlamydia trachomatis* one of the important species in this group, is classified into three biovars as a result of their evolution. Two of those biovars, Trachoma and LGV, are pathogens only in humans. Initially, the presence of a high specificity between the host and chlamydiae has been recognized and this relation has been considered as an adaptation mechanism. However, some studies have indicated that chlamydiae can also grow in laboratory animals, yolk sacs of embryonated eggs and in vitro cell cultures. The aim of this study was to investigate if *C.trachomatis* human specific biovars are possible infectious agents in the aborted bovine fetuses. Ninety aborted bovine fetuses were included in the study, and the bacteria which could be the causative agents for abortion were searched by conventional microbiological methods. Twenty-three (25.6%) abortion materials which have yielded negative results with these methods for the presence of bacterial agents other than chlamydiae, were further evaluated in terms of the presence of *C.trachomatis*. For this purpose the samples were inoculated into the yolk sac of embryonated eggs and the slides prepared from the yolk sac membranes of embryos died after 24 hours of inoculation, were examined for the presence of inclusion bodies by staining with Giemsa method. The presence of *C.trachomatis* specific antigens and glycogen inclusions in those 23 samples were also investigated by immunohistochemical and Lugol's iodine staining methods, in the fetal tissue samples which were embedded in paraffin. Immunohistochemical method was performed with immunoperoxidase staining by the use of specific antibodies against *C.trachomatis* major outer membrane proteins. As a result, 5 (21.7%) of the 23 samples were found positive for *C.trachomatis* with three of the methods (Giemsa, immunoperoxidase and lugol stainings). Although the data of our study have supported that chlamydiae can adapt to new host species other than humans, further advanced studies are needed on this subject. Our results have also emphasized that novel routes of transmission should be considered for *C.trachomatis* infections.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, host specificity, immunoperoxidase staining, iodine staining, aborted bovine fetus.

GİRİŞ

Zorunlu hücre içi yaşama gereksinim gösteren ve en küçük bakteri grubu olarak kabul edilen klamidyalar, kendilerine özgü bir çoğalma döngüsüne sahiptir¹. Bu gruptaki en önemli patojen olan *Chlamydia trachomatis*, dünyada cinsel yolla bulaşan etkenler arasında ilk sıralarda yer almaktadır^{1,2}. Kadın ve erkeklerde akut enfeksiyonların yanı sıra fırsatçı enfeksiyonlara da yol açan bu bakteri, kadınlarda üst genital yollarda yerleştiğinde uzun dönemde ciddi komplikasyonlar oluşturabilmektedir. Üç biyotipi bulunan *C.trachomatis*, hücre duvarındaki majör dış membran proteinleri (MOMP)'ne karşı meydana gelen immün yanıtı göre serotiplere ayrılmaktadır. Okülo-genital hastalıklarla ilişkili olan "Trachoma" biyotipinin A'dan K'ya kadar harflerle ifade edilen 11 ve bunların yanı sıra Ba, Da ve Ia olmak üzere toplam 14 serotipi mevcuttur. A, B, Ba ve C serotipleri trahom hastalığına; B, Ba ve A-K serotipleri daha ziyade cinsel yolla bulaşan hastalık-

lara ve inklüzyon konjunktivitine neden olur. Bakterinin "LGV" biyotipi ise lenfogranülo-ma venerum (LGV) hastalığına yol açar ve L1, L2, L2a ve L3 serotiplerine sahiptir. *C.trachomatis*'in üçüncü biyotipi olan "Mouse Pneumonitis" ise insanda hastalık oluşturmamak-tadır^{1,3}. Enfeksiyonlar, insanlar arasında herhangi bir vektör gerekmeksizin, damlacık yo-lu, yakın temas, ortak eşya kullanımı ve cinsel yolla doğrudan yayılmaktadır.

Klamidya ile bulunduğu konak arasında zaman içerisinde gelişen uyum, konak özgül-lüğünü oluşturmuştur ve bu da *Chlamydiaceae* ailesine ait bakterilerin ekolojik sınıflan-dırmasında kullanılan kriterlerden biri olmuştur^{3,4}. Ancak daha sonra, klamidya enfeksi-yonu ile birlikte, diğer bakteri ve virus enfeksiyonları ile konağa ait durumların da değ'erlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür. Nitekim birçok *Chlamydia* türünün embriyonlu yu-murtanın sarı kesesinde üretilmesi, *C.trachomatis*'in öküzlardan (kısırlaştırılmış boğa) izo-le edilmesi, insan izolatu *C.pneumoniae*'nin amiplerde üretilmesi, *C.pecorum*'un koyun ve sığır izolatları ile *C.trachomatis* insan izolatlarının kobaylarda ve farelerde üretilmesi, kuş-lardan izole edilen *C.psittaci*'nin memelilerde ve kara kaplumbağalarında üretilmesi, kla-midyaların sınıflandırmasında konak özgüllüğünün kesin belirleyici bir kriter olarak kulla-nılamayacağını düşündürmektedir⁴⁻⁶. Bu görüşten hareketle bu çalışmada, insanlarda enfeksiyon etkeni olan ve düşüğe sebep olabileceği bilinen *C.trachomatis*'in sığırlar için de patojen olup olmadığını sorgulamak amacıyla, atık sığır fetuslarında düşüğe sebep olabilecek herhangi bir bakteriyel etkenin saptanamadığı örneklerde, *C.trachomatis*'in immünoperoksidaz ve iyot boyama yöntemleri ile araştırılması planlanmıştır. Literatür in-celemelerinde bir benzerine rastlayamadığımız bu çalışma, insana özgün bir bakterinin farklı bir konaktan izole edilmesini amaçlamanın yanı sıra, insanlar için yeni bir enfeksi-yon kaynağı olasılığını da gündeme getirmesi bakımından önemlidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, 2006 yılında Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Laboratu-varlarına gönderilen 90 adet atık sığır fetusu (düşük materyali) kullanıldı. Örnekler ilk aşamada, *Chlamydia* dışında düşük etkeni olabilecek diğer bakterilerin varlığının araştı-rılması için geleneksel bakteriyolojik yöntemler ile değerlendirildi⁷.

Klamidya kültürü için fetal doku ve organlardan uygun koşullarda hazırlanan örnek-ler, 6-8 günlük embriyonlu tavuk yumurtası sarı kesesine ekildi ve kontrol grubu embri-yonlu yumurtalarıyla birlikte 37°C'de %75-80'lik nemli kuluçka etüvlerinde inkübasyona bırakıldı⁸. İlk 24 saat içinde ölen embriyonlar değerlendirmeye alınmadı ve tekrar aynı örneklerden yeni yumurta ekimleri yapıldı. İlk 24 saatten sonra ölen embriyonlar açıldı ve yumurta sarı kesesi membranından hazırlanan sürme preparatlar (frotti) Giemsa ile boyanarak inklüzyonlar yönünden değerlendirildi. Ekimleri izleyen 10 günlük inküba-syon döneminde ölen embriyonlardan hazırlanan preparatlara da Giemsa boyası uygu-landı; ölüm görülmeyen örnekler ise negatif kabul edilmeden önce iki kör pasaj daha ya-pılarak aynı işlem yürütüldü⁸.

İmmünohistokimyasal yöntemde, sığır düşük materyallerinden hazırlanan parafin do-ku kesitlerinde *C.trachomatis*'in MOMP'lerine özgül antikorlar kullanılarak immün işaret-leme yapıldı. Bu amaçla fetal karaciğer, akciğer ve dalaktan alınan doku örnekleri

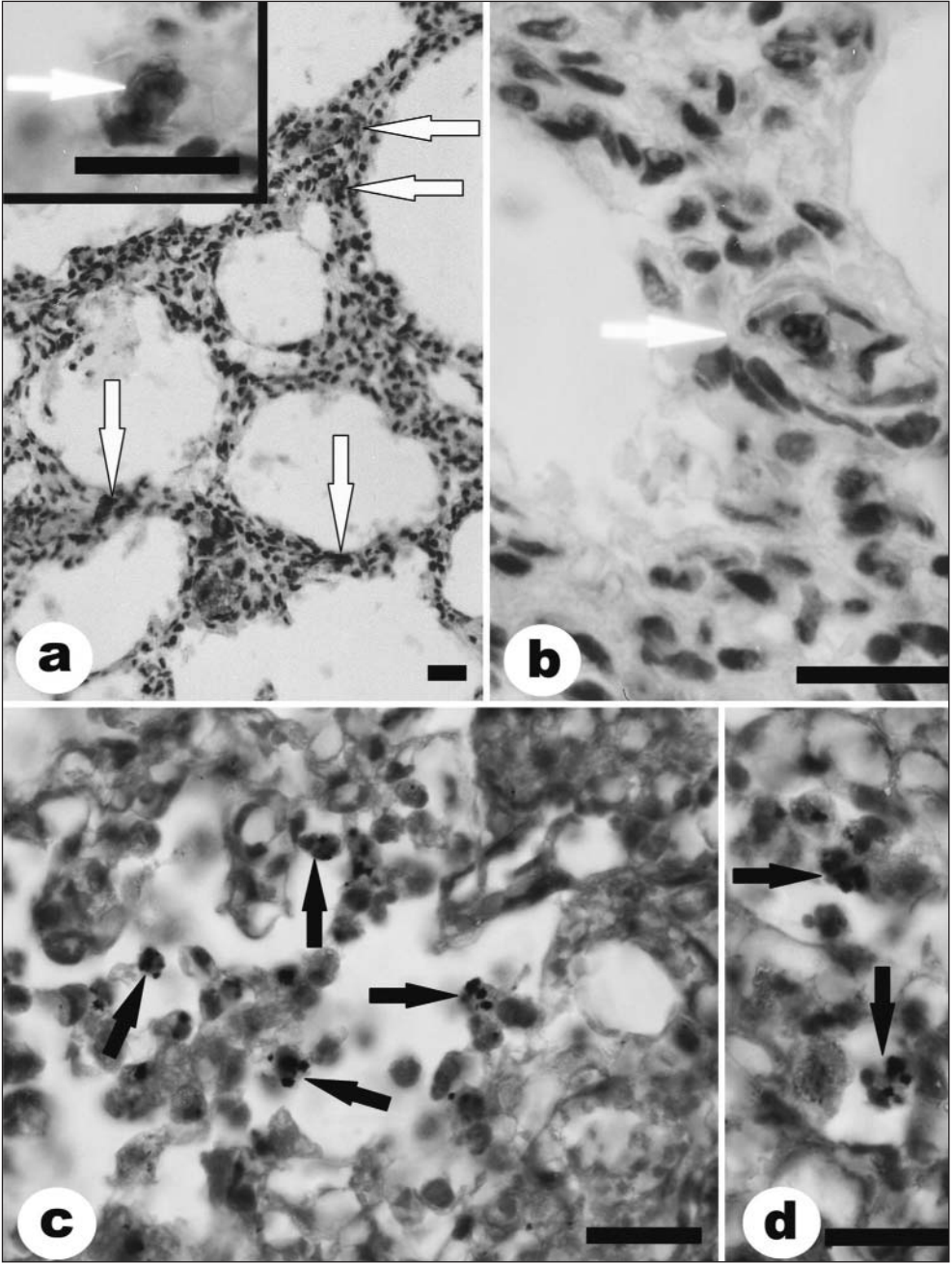
%10'luk nötral formalinde tespit edildikten sonra rutin histolojik yöntem kullanılarak parafine gömüldü^{9,10}. Düşük etkeni olabilecek herhangi bir bakteriyel etken saptanamayan örneklerin parafin doku bloklarından "Leica® Jung RM 2055 Rotary Microtom" cihazı kullanılarak 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı ve immünoperoksidaz (İP) boyama yapıldı⁷. Bu boyama için, standart avidin-biotin-peroksidaz yöntemini kullanan ticari bir kit (Cadenza Tags peroxidase kit with AEC; Catalog no: 407300, Shandon Immunon-Thermo Electron, Pittsburg, PA, USA) kullanıldı. Primer antikor olarak keçide hazırlanmış anti-*C.trachomatis* EBs polyclonal IgG (AbD Serotec®; Catalog number: 1990-0404, Oxford, UK) kullanıldı. Avidin-biotin kompleks İP boyama işlemi, "Sequenza™ Immunostaining Center" (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) cihazında manuel olarak yapıldı⁹⁻¹³. Primer antikor solüsyonunun en uygun dilüsyon oranı ve uygulama süresi, farklı süreler ve dilüsyonlar denenerek belirlendi. En iyi sonuçlar, primer antikorun 37°C'de, 1 saat süre ve 1/400 dilüsyonda uygulanması ile elde edildi. Hematoksilen ile zemin boyaması yapıldıktan sonra, lamalar su bazlı bir kapatma maddesi olan "GVA mounting solution" (Zymed® Laboratories; Catalog no: 00-8000) kullanılarak lamel ile kapatıldı. Preparatlar bir Olympus C5050 dijital kamera ekipmanlı Olympus CX41 (Tokyo, Japan) araştırma mikroskopunda incelenerek resimleri çekildi. Ayrıca, İP boyama sonucunda *C.trachomatis* antijeni saptanan doku örneklerinin mevcut parafin bloklarından hazırlanan yeni kesitlere, 25 dakika süreyle lugol (iyot) solüsyonu uygulandı¹⁴ ve steril distile su ile yıkanıldıktan sonra zemin boyaması için 90 saniye hematoksilen ile boyandı. Lamelle kapatıldıktan sonra Olympus CX41 mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 90 adet atık sığır fetusunun 23'ünde, geleneksel bakteriyolojik yöntemlerle düşük sebebi olabilecek başka bir bakteriyel etken gösterilememiştir. Bu 23 atık fetusa ait örneğin embriyonlu yumurta ekimlerinde, 24 saatten sonra ölen embriyonların 5 (%21.7)'ine ait sarı kese yayma preparatında Giemsa boyama ile inklüzyon cisimcikleri görülmüş; aynı örnekler İP ile boyama sonucunda da *C.trachomatis* elementer cisimleri yönünden pozitif bulunmuştur (Resim 1a ve 1b). Ayrıca, İP ile *C.trachomatis* antijeni saptanan 5 doku örneğinin lugol ile boyalı preparatlarında, özellikle makrofajların içinde koyu kahverengiden siyaha kadar değişen renklerde intrasitoplazmik inklüzyonlar saptanmıştır (Resim 1c ve 1d). Siyah boyanan hücre içi inklüzyon cisimciklerinin, makrofajlar tarafından fagosite edilen bakterinin glikojen depolarından kaynaklandığı düşünülmüş; konağın hepatosit ve kondrosit gibi diğer hücre tiplerinde gözlenen glikojen depolarından farklı olarak daha belirgin koyulukta olan bu inklüzyonların, özellikle akciğer kesitlerinde alveoler makrofajlar içinde lokalize olduğu izlenmiştir.

TARTIŞMA

Günümüzde en çok ilgi gören insan patojenleri arasında yer alan klamidyalar, insan ve hayvanlarda ciddi hastalıklara yol açmaktadır. *C.trachomatis*'in laboratuvar tanısında, 1970 ve 1980'li yıllarda yaygın olarak kullanılan hücre kültürleri ve embriyonlu yumurtadan izolasyon gibi geleneksel mikrobiyolojik yöntemler, günümüzde yerini daha pratik ve hızlı yöntemlere bırakmıştır². Bu amaçla, klinik örneklerde bakteriyel antijen-



Resim 1. Atık sığır fetuslarından alınan akciğer kesitlerinin immünoperoksidaz (a, b) ve lugol (c, d) ile boyandıktan sonra elde edilen ışık mikroları. Beyaz ok, *C.trachomatis* elementer cisimlerine ait antijenlerin pozitif olduğu alanları; siyah ok, özellikle alveoler makrofajlar içinde siyah renkte boyanmış glikojen inklüzyonlarını göstermektedir (Barların uzunluğu: 60 µm).

lerin tespitini mümkün kılan enzim ve floresan temelli yöntemler (sırasıyla, EIA ve DFA) ve immünoperoksidaz (İP) gibi immünohistokimyasal yöntemlerin yanı sıra, MOMP gen bölgelerini (*ompA-omp1*) saptayabilen ya da gen dizi analizi yapılabilen moleküler yöntemler de kullanılabilir²⁻⁴. Çalışmamızda da, sığır fetusu örneklerinde *C.trachomatis*'e özgül MOMP antijenleri İP yöntemiyle gösterilmiştir. Ancak bu yöntemle, patojenite ve konak özgüllüğü yönünden farklı özellikler gösteren iki biyotip olan *Trachoma* ve *LGV* arasında ayırım yapılabilmesi, çapraz reaksiyon olasılığı nedeniyle mümkün olmamıştır.

Klamidyaların doğadaki yayılımında evrimsel gelişimin rolü olduğu ve bu bakterilerin tek hücreli ökaryotlardan çok hücreli konaklara doğru bir yayılım göstermiş olabileceği düşünülmektedir^{3,4}. Bu yayılım, hayvan hücresindeki "yoğun seçici baskı" ile tüm klamidya gruplarını etkilemiş ve ailenin tüm üyeleri omurgalılarda enfeksiyon etkeni olma özelliği kazanmıştır. Zaman içerisinde klamidya-hayvan türü arasındaki adaptasyon, ekolojik olarak farklı klamidya popülasyonlarını ortaya çıkarmıştır^{3,4}. Bu "yoğun seçici baskı" her zaman için rRNA dizileri üzerinde fazla etkili olmamışsa da, DNA-DNA homolojilerinde dikkate değer farkları oluşturmuştur. DNA dizilerindeki farklılaşmalar bakterilerin gen büyüklüklerini etkilemelerinin yanı sıra, özellikle bakterinin glikojen oluşturma yeteneklerinde ve sülfadiazin duyarlılığında farklılıklara yol açmıştır. Bakterinin glikojen üretmesi, besin ihtiyacının tam olarak karşılanamaması ile ilişkilidir. Dolayısıyla beslenme eksikliği olmayan klamidya türlerinde bu gen bölgesi zaman içerisinde delesyona uğramıştır^{3,4}. Ancak bu gen bölgesi *C.trachomatis*'te mevcut olduğundan, diğer klamidya türlerinden farklı olarak glikojen inklüzyonları içermektedir ve bu çalışmada lugol boyama ile incelenen dokulardaki makrofajlarda belirgin olarak gösterilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, *C.suis* ve *C.muridarum* suşlarının *C.trachomatis* ile benzer MOMP yapılarına sahip olabileceği ve bu nedenle immünolojik testlerde çapraz reaksiyon verebileceği; ayrıca zaman zaman ve çok az miktarda glikojen sentezleyebileceği ifade edilmektedir^{4,15}. Çalışmamızda kullanılan primer antikolar, olası çapraz reaksiyonlar yönünden güvenilir olabilmesi amacıyla değişik dilüsyonlarda denenmiş ve en uygun sonuç 1/400 dilüsyonda elde edilmiştir. Glikojen birikiminin gösterilmesinde geçerli ve pratik bir yöntem olan lugol boyamanın uygulandığı preparatlarda gözlenen siyah renkteki yoğun sitoplazmik inklüzyonlar ise bakteriyel glikojen birikimi olarak değerlendirilmiştir. Bu yoğun inklüzyonların İP boyamayla pozitif olan örneklerde gözlenmesi ve son derece belirgin olması, *C.trachomatis*'e ait glikojen birikimleri şeklinde yorumlanmıştır.

Sonuç olarak, *C.trachomatis*'in güvenilir kabul edilemeyecek bir konak özgüllüğünün olduğu düşüncesinden hareketle yapılan bu çalışmada, atık sığır fetusu dokularının %21.7'sinde *C.trachomatis* antijen varlığı gösterilmiş ve başka bir bakteriyel etken saptanamadığı için düşüğe yol açabilecek bir enfeksiyon etkeni olabileceği düşünülmüştür. Bu durum, bakteri ile farklı konak arasında zamanla gelişmesi olası uyum mekanizmalarıyla açıklanabilir. Klamidyaların evrimsel gelişimini açıklayan çalışmalara kat-

kı sağlayacağını düşündüğümüz bu araştırma aynı zamanda, enfeksiyon zincirinde yer alabilecek yeni bir bulaş kaynağını da tanımlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kalayoglu MV, Byrne GI. The genus *Chlamydia*, pp: 741-54. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds), *The Prokaryotes*, Vol. 7. 2006, 3rd ed. Springer Science & Business Media, LLC, Singapore.
2. Lo ACT, Kam KM. Review of molecular techniques for sexually transmitted diseases diagnosis, pp: 357-60. In: Tang YW, Stratton CW (eds), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. 2006, Springer Verlag, New York.
3. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 415-40.
4. Everett KD. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet Microbiol* 2000; 75: 109-26.
5. Deptula W, Ruczkowska J, Szenfeld J, Choroszy-Krol I, Travnick M. Immunologic status in cattle naturally infected with the microorganisms *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *Vet Med* 1990; 35: 73-80.
6. Kuo C-C, Lee A, Jiang S-J, Yaraei K, Campbell LA. Inoculation of *Chlamydia pneumoniae* or *Chlamydia trachomatis* with ligands that inhibit attachment to host cells reduces infectivity in the mouse model of lung infection: implication for anti-adhesive therapy. *Microb Infect* 2007; 9: 1139-41.
7. Winn W, Allen S, Janda W, et al (eds). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2006, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
8. Office International Epizootica. Epizootic abortion of ewes. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines 2000. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00073.htm (Erişim tarihi 05.01.2007).
9. Hayat MA. *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods For Light and Electron Microscopy*. 2002, 1st ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
10. Boume JA. *Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods*. 1985, Institute of Medical and Veterinary Science, The Queen Elizabeth Hospital Division, Department of Histopathology. Daco Corporation, California.
11. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1131-9.
12. Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
13. Ekmen F. Immünoenzim tekniklerinin histopatolojiye uygulanması. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 1992; 7: 33-50.
14. Isenberg HD. Isolation of *Chlamydia* spp. in cell culture, pp: 10.6.9. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2004, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
15. Chae C, Cheon DS, Kwon D, et al. In situ hybridization for the detection and localization of swine *Chlamydia trachomatis*. *Vet Pathol* 1999; 36: 133-7.