



Erzurum İlinde Sığır Abortlarında *Coxiella burnetii*'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi*

Ömer Faruk KÜÇÜKKALEM¹, Seyda CENGİZ^{2✉}, Serap KILIÇ ALTUN¹, Metin YILDIRIM²

1. Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Erzurum, Türkiye.
2. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.

Özet: Bu çalışmada, Erzurum ilindeki sığır abortlarında *Coxiella burnetii* varlığının moleküler olarak belirlenmesi amaçlandı. Çalışma da 100 adet aborte olmuş sığır fötüsü incelendi. Sığır fötüslerinden örnekler (fötal karaciğer-dalak) alınarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. *C. burnetii* saptanması için C.B.-1 (5'-ACT CAA CGC ACT GGA ACC GC-3') ve C.B.-2 (5'-TAG CTG AAG CCA ATT CGC C-3') primerleri kullanıldı. Yapılan amplifikasyon ve görüntüleme işlemleri sonucunda 100 aborte fötüs örneğinin 6'sında (%6) *Coxiella burnetii* yönünden pozitiflik bulundu. Sonuç olarak, Erzurum ilindeki sığır abortlarında *Coxiella burnetii*'nin de varlığının göz önüne alınması gerekliliği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Abort, *Coxiella burnetii*, PCR, Sığır.

Determination of *Coxiella burnetii* in Cow Abortions by Polymerase Chain Reaction in Erzurum Province

Abstract: Molecular detection of *Coxiella burnetii* from cow abortions was aimed in this study. One hundred aborted cow foetuses were investigated. DNA extraction was done from foetal tissues (foetal liver and spleen). Primers C.B.-1 (5'-ACT CAA CGC ACT GGA ACC GC-3') and C.B.-2 (5'-TAG CTG AAG CCA ATT CGC C-3') were used for determination of *Coxiella burnetii*. *Coxiella burnetii* was found to be positive by amplification and imaging in the 6 out of 100 samples. As a result, the presence of *Coxiella burnetii* should be taken into account for cow abortions in the vicinity of Erzurum.

Key words: Abortus, *Coxiella burnetii*, Cow, PCR.

✉ Seyda CENGİZ

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.
e-posta: seydacengiz@atauni.edu.tr

* Bu çalışma X. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Coxiella burnetii insan ve hayvanlarda Q Humması'na neden olan zorunlu hücre içi bir bakteridir. Enfeksiyon hayvanlarda çoğunlukla subklinik seyirlidir. Geç dönemde abortlar, ölü doğumlarla birlikte hayvanlarda infertilite spesifik bulgudur. Epidemik vakalarda koyun ve keçilerde abortlar ve süt sığırlarında reproduktif bozukluklar ve mastitis daha sıklıkla görülmektedir. Enfekte hayvanların idrar, dışkı, süt, plesanta ve doğum çıkartıları ile fazla sayıda etken dışarı atılır (Kim ve ark., 2005; Clement ve ark., 2009). Hastalığın akut döneminde kan, akciğer, dalak ve karaciğerden sıklıkla izole edilen bakteri, kronik dönemde uterus ve meme bezlerine yerleşir. Bu nedenle doğum çıkartıları ve süt enfeksiyonun yayılmasında etkilidir. İnsanlar için sığır, koyun ve keçiler önemli bulaşma kaynaklarını oluşturmaktadır (Kim ve ark., 2005; Kırcan ve ark., 2008; Borriello ve Galiero, 2012). Coxiellosis'in teşhisinde kültür, serolojik ve moleküler metotlar kullanılmaktadır. Ancak, kültür ve serolojik metotların uygulanmasındaki biyogüvenlik ve teknik gereksinimler ile enfeksiyonun akut fazlarında serolojik tespitinin zor olması teşhisi moleküler metotlara yönlendirmiştir (Kalender 2001; Berri ve ark., 2005; Parisi ve ark., 2006; Kırcan ve ark., 2008; Parisi ve ark., 2010).

Araştırmacılar bakterinin DNA yapısının belirlendiği moleküler metotların serolojik ve kültür metotlarına göre daha güvenilir yöntemler olduğunu belirlemişlerdir. Moleküler testlerin düşük deteksiyon limitine sahip ve yüksek duyarlı olması aynı zamanda taşıyıcı hayvanları da kısa sürede belirlemesi bu metotların güvenilirliğini arttırmaktadır. Ayrıca, moleküler teknikler ile Q fever için yapılan taramalarda klinik örneklerdeki *C. burnetii*'nin hızlı bir şekilde belirlenmesi sağlanır. Böylece, kontrol önlemleri alınarak tedaviye başlama süreci kısalmıştır. Son zamanlarda, pek çok PCR metodu geliştirilmiş olup, en sık olarak süperoksit dismutaz ve transpozon bölgeleri hedef alınarak

geliştirilen PCR metotları kullanılmaktadır (Stein ve Raoult 1992; Kalender 2001; Parisi ve ark., 2006; Kırcan ve ark. 2008).

Bu çalışmada, 100 adet aborte sığır fötusunda süperoksit dismutaz genini kodlayan primerler ile PCR metodu kullanılarak *C. burnetii* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Erzurum ilinin farklı ilçelerinden Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne getirilen 100 adet aborte sığır fötusu çalışma materyalini oluşturmaktadır. Aborte fötuslardan alınan fetal dalak, karaciğer ve mide içeriği örnek olarak kullanıldı. Örnekler DNA ekstraksiyonu yapılabildiği kadar -20 °C'de saklandı.

DNA Ekstraksiyonu

Uygun şekilde hazırlanan doku örnekleri mekanik olarak parçalandıktan sonra 180 ml PBS içinde homojenize edildi. Homojenizattan 200 µl alınarak üretici firmanın kit prosedürlerine göre DNA ekstraksiyonu yapıldı (Fermentas-Genomic DNA Purification Kit. 2011. Thermo Fisher Scientific Inc.).

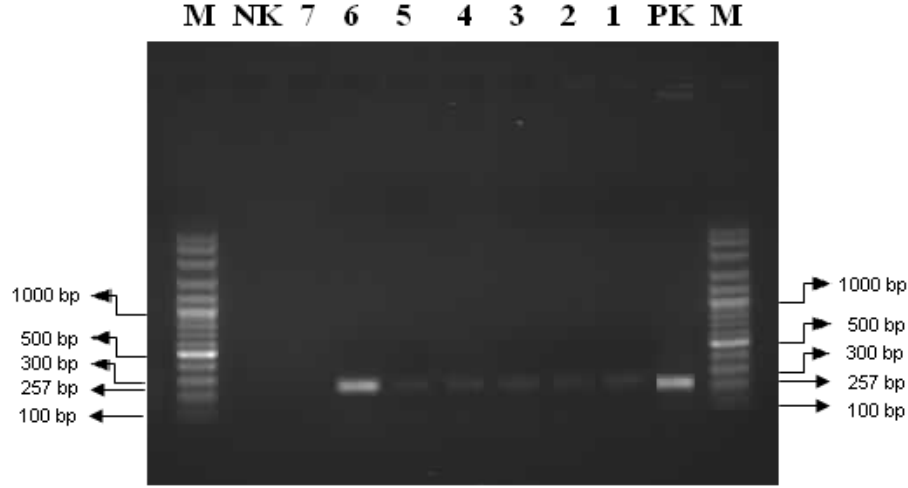
DNA Amplifikasyonu

PCR işlemi Stein ve Raoult (1992)'un bildirdiği metoda göre gerçekleştirildi (Stein ve Raoult 1992). PCR reaksiyonu otomatize DNA termalcyclus cihazında yapıldı. Amplifikasyon işlemi sonunda ürünler %1'lik agaroz jelde elektroforez edildikten sonra fotoğraflandı. Primer olarak *C. burnetii*'nin süperoksit dismutaz genini kodlayan primer çiftleri kullanıldı (primer C.B.-1 [5'-ACT CAA CGC ACT GGA ACC GC-3'] ve primer C.B.-2 [5'-TAG CTG AAG CCA ATT CGC C-3']). Pozitif kontrol DNA, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı.

BULGULAR

PCR'da, 257 bp'lik bantlar pozitif olarak değerlendirildi. Toplam, 100 aborte sığır fötusunun

6'sında (%6) *C. burnetii* yönünden pozitiflik belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Pozitif örnekler. M: Marker (O'Rangeruler 100 bp DNA Ladder-Fermentas-Lithiunia). PK: Pozitif Kontrol DNA (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD.). 1-6: *C. burnetii* pozitif örnekler. 7: Negatif Örnek. NK: Negatif Kontrol.

Figure 1. Positive samples. M: Marker (O'Rangeruler 100 bp DNA Ladder-Fermentas-Lithiunia). PC: Positive Control DNA (Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Division of Microbiology). 1-6: Positive samples for *C. burnetii*. 7: Negative Sample. NC: Negative Control.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Özellikle büyükbaş ruminantlardaki abort vakalarında Brusellosis ilk akla gelen enfeksiyon iken, bunu Listeriosis, Kampilobakteriosis ve Salmonellosis gibi enfeksiyonlar izlemektedir. Coxiellosis ülkemizdeki abort olgularında son dönemlerde daha sık incelenen ve varlığı ortaya konulan zoonoz karakterde bir enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2000). Dünyanın büyük bir bölümünde endemik olarak görülen enfeksiyonun, serolojik taramalarda sığır, koyun ve keçi popülasyonunda bulunduğu bildirilmektedir. Sığırlarda, ekonomik öneme sahip üreme sistemi problemlerine neden olan enfeksiyonda, bakteri enfekte dişi hayvanların dışkı, idrar ve sütleri ile yayılım gösterir (Arricau ve ark., 2003; Berri ve ark., 2005). Klinik belirti göstermeyen, seropozitif hayvanlarda da etken sütle dışarı atılır

(Rodolakis ve ark., 2006). Doğum sırasında yada abort sonrasında hayvanlardan toplanan fötus, plasenta, süt, kolostrum, dışkı ve vajinal çıkartılar teşhis amacıyla kullanılır. Coxiellosis kaynaklı abort salgınlarının sürülerde erken belirlenmesi ve biyogüvenlik önlemlerinin alınması hem çevresel hem de çiftlik bazlı kontrol önlemleri ile sağlanır. Sürüde birden fazla abort yada ölü doğum şekillenmiş ve alınan örneklerde pozitiflik, serolojik muayenede seropozitiflik belirlenmiş ise sürüye Coxiellosis tanısı konur. Coxiellosis teşhisinde farklı metotların kullanılmasına rağmen moleküler analizlerin biyogüvenlik riski oluşturmadan kısa sürede ve erken dönemde enfeksiyon varlığını belirlemesi bu analizleri avantajlı duruma getirmiştir (Borriello ve Galiero, 2012).

C. burnetii kaynaklı insan enfeksiyonları ülkemizde %11.2-19.5 arasında değişmektedir. Bu

oran, Avrupa'da %1-11 oranında değişirken, Amerika'da %3.4, Fransa'da %5.8 oranında belirlenmiştir. Dışkı, idrar, süt gibi çıkartılar ve abort materyali bulaşmada oldukça önemlidir. Bu çıkartılar aracılığıyla etken tozlar ile solunum yolundan da alınarak potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olmaktadır (Kırkan ve ark., 2008). İnsan enfeksiyonlarında, enfeksiyon kaynağının koyunlardan daha çok süt sığırları olduğu belirlenmiştir. Seyitoğlu ve ark. (2006), Erzurum ilinde insanlar için yaptıkları taramada 92 insan kanında 18 adet pozitiflik saptamışlardır. Amerika'da, 2001-2003 yıllarında 316 süt örneğinde yapılan *C. burnetii* taramasında 298 adet pozitiflik belirlenmiştir (APHIS, 2007; Kim ve ark., 2005). Agger ve ark. (2010), Danimarka'da 100 adet tank sütünde %59 oranında pozitiflik bildirmişlerdir.

Çalışmalarda, Coxiellosis prevalansı ülkelere ve hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir. Amerika ve Japonya'da Coxiellosis keçilerde, koyun ve sığırlara göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Ülkemizde ise Coxiellosis prevalansının küçük ruminantlarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000). Yugoslavya'da, geçmişinde abort vakası bildirilen sürülerde Coxiellosisin %19.4 oranında pozitiflik gösterdiği belirlenirken, Japonya'da bu oran %30 olarak bildirilmiştir (Seyitoğlu ve ark., 2006). Avrupa ülkelerinin genelinde Coxiellosis taramalarında hastalığın %7.4'ten % 10'a çıktığı belirlenmiş, özellikle keçilerde hastalığın artış gösterdiği bildirilmiştir. Sudan'da %40 olan hastalık oranı, Meksika'da %23, Avustralya'da %40, İsviçre'de %26-28 olarak saptanmıştır. Enfeksiyon, ülkemizde bölgelere göre farklılık gösterirken, Leloğlu (1977) Doğu illerindeki sığırlarda %15.6 oranında pozitiflik bildirmiştir. Seyitoğlu ve ark. (2006), Erzurum ilinde sığırlarda %9.5'lük pozitiflik belirlerken, abort yapmış 53 hayvanın 22'sinde (%41.5), sağlıklı 177 hayvanın 10 (%5.6) tanesinde pozitiflik bildirmişlerdir. Çetinkaya ve ark. (2000) sığırlarda %5.8, koyunlarda ise %10.5 pozitiflik bildirmişlerdir. Moleküler düzeydeki çalışmalarda ise Kırkan ve ark. (2008) 138 şüpheli

sığırdan yaptıkları örneklemelerin PCR analizinde 6 (%4.3) adet pozitiflik saptamışlar, Cantaş ve ark. (2011) 51 sığır abort materyalinde 18 (%35) adet pozitiflik bildirmişlerdir. Clemente ve ark. (2009), 29 sığır abort materyalinin PCR'ında 5 (%17.2) adet pozitiflik belirlemişlerdir. Parisi ve ark. (2006), 138 adet sığır abortundan alınan örneklerde 16 örnekte (%11.6) pozitiflik saptamışlardır. Sığır ve mandalardaki enfeksiyon varlığı moleküler olarak %12.5 oranında bildirilmiştir. Bu çalışmada ise PCR ile %6 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Bu oran, Kırkan ve ark. (2008)'dan yüksek düzeyde bulunurken, Çetinkaya ve ark. (2000)'nin sonuçlarına yakın bulunmuştur. Ayrıca, diğer araştırmacıların bulgularından düşük düzeyde pozitiflik saptanmıştır. Erzurum'da daha önce yapılan araştırmalar ile de karşılaştırıldığında, Coxiellosis pozitifliğinin azaldığı belirlenmiştir. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın, hayvanların yetiştirilme koşulları, uygulanan aşı ve eradikasyon programları ve hayvanların sağlandıkları bölgelerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Enfeksiyonun hayvan ve insanlardaki bulaşma ve seyri, teşhisinde karşılaşılan problemlere bağlı olarak enfeksiyonun hızlı teşhisi önem kazanmaktadır. Bu durum da PCR tabanlı teşhis metodlarını üstün kılar.

Sonuç olarak, Erzurum ilinde sığırlarda Coxiellosis'in belirlenmesi bu ilde Coxiellosis için gerekli koruma kontrol önlemlerinin alınmasını gerektirmektedir. PCR ile enfeksiyonun belirlenmesi, Coxiellosis'in sığırlarda varlığını hızlı bir şekilde tespit ederek, olabilecek salgınlara karşı gerekli önlemlerin alınmasını sağlar.

KAYNAKLAR

- Agger JF., Christoffersen A., Rattenborg E., Nielsen J., Agerholm JS., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish dairy herds. Acta Vet Scand., 52, 1-5.
- APHIS. Prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk-tank milk on U.S. dairy operations, 2007. http://www.aphis.usda.gov/animal_health/na

- [hms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_Coxiella.pdf](https://hms.dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_Coxiella.pdf). Erişim: [08.05.2012]
- Arricau BN., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. Vet. Res., 34, 423-433.
- Berri M., Crochet D., Santiago S., Rodolakis A., 2005. Spread of *Coxiella burnetii* infection in a flock of sheep after an episode of Q fever. Vet. Rec., 157, 737-740.
- Borriello G., Galiero G., 2012. *Coxiella burnetii*. In "Zoonosis", J. Lorenzo-Morales 65-88 <http://www.intechopen.com/books/zoonosis/coxiella-burnetii>. [Erişim: 02.05.2012].
- Cantas H., Muwonge A., Sareyyupoglu B., Yardimci H., Skjerve E., 2011. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. BMC Vet. Res., 7, 13.
- Clemente L., Barahona M. J., Andrade M. F., Botelho A., 2009. Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. Vet. Rec., 164, 373-374.
- Çetinkaya B., Kalender H., Ertuş HB., Muz A., Arslan N., Öngör H., Gürçay M., 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. Vet. Rec., 146, 131-136.
- Kalender H., 2001. Elazığ ve komşu illerdeki koyunlarda *Coxiella burnetii* enfeksiyonunun yaygınlığı. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 25, 51-55.
- Kırkan Ş., Kaya O., Tekbıyık S., Parın U., 2008. Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 32, 215-220.
- Kim SG., Kim EH., Lafferty CJ., Dubovi E., 2005. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. Emerg. Infect. Diseases, 11, 619-621.
- Leloğlu N., 1977. Erzurum, Kars ve Ağrı İllerinde Q Humması üzerinde çalışmalar. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 8, 113-131.
- Parisi A., Fracalvieri R., Cafiero M., Miccolupo A., Padalino I., Montagna C., Capuano F., Sottili R., 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. Vet. Microbiol., 118, 101-106.
- Rodolakis A., Berri M., He'chard C., Caudron C., Souriau A., Bodier CC., Blanchard B., Camuset P., Devillechaise P., Natorp JC., Vadet JP., Bouvery NA., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. J. Dairy Sci., 90, 5352-5360.
- Seyitoğlu Ş., Özkurt Z., Dinler U., Okumuş B., 2006. The seroprevalence of Coxiellosis in farmers and cattle in Erzurum district in Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 30, 71-75.
- Stein A., Raoult D., 1992. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol., 30, 2462-2466.