



Koyun ve Keçi Sütlerinde *Coxiella burnetii* Varlığının PCR ile Araştırılması

Ayşe KILIÇ¹✉

1. Fırat Üniversitesi, Sivrice Meslek Yüksekokulu, Elazığ, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
08.06.2016	06.03.2017	30.10.2017

Öz: Q humması, büyük ölçüde geniş getiren hayvanların süt, vajinal mukus ve dışkı gibi ürünlerle dışarıya saçtığı *Coxiella burnetii* bakterisinin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Sığır, koyun ve keçiler etkenin insanlara bulaşmasında primer rezervuar konakçılardır. Bu çalışmada abort yapan ve yapmayan farklı koyun ve keçi sürülerinden toplanan 120 süt örneği, *C.burnetii* suşunun transpozon repetitive gen bölgesinden türetilen tür spesifik Trans 1 ve 2 primerleri kullanılarak PZR amplifikasyonuna maruz bırakıldı. Elazığ ve komşu illerden toplanan sütlerde abort yapmış koyunlarda %10 ve abort yapmış keçilerde ise %3.33 oranında *C.burnetii* DNA'sı PZR ile pozitif olarak tespit edildi. Abort yapmayan sürülerden alınan koyun ve keçi sütü örneklerinde PZR testi ile pozitiflik saptanmadı. Sonuç olarak abortus öyküsü olan ve olmayan koyun ve keçi sürülerinden toplanan süt örneklerinde *C.burnetii* enfeksiyonunun moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *C. burnetii*, PZR, Süt.

The Investigation of Presence *Coxiella burnetii* in Sheep and Goat Milk by the PCR

Abstract: Q fever is a zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii* bacteria, which shedding into largely ruminant animals with products such as milk, vaginal mucus and stools. Cattle, sheep and goats are primary *C. burnetii* reservoir hosts. In this study, 120 milk samples were collected from different sheep and goat herds which aborting and non-aborting and A PCR was performed with Trans 1 and Trans 2 primers derived from transposon repetitive gen region. The milk samples obtained from herds belonging aborted sheep in Elazığ and neighboring provinces showed a total of 10% were detected positivity, whereas the 3.33% milk sample taken from aborted goat herds were observed *C. burnetii* as positive by the PCR. The milk samples taken from non-aborted sheep and goat herds weren't observed positivity by the PCR test. As a result, it is aimed to investigate *C.burnetii* infection in goat and sheep milk samples obtained from belonging aborted and non-aborted flocks by molecular methods.

Keywords: *C.burnetii*, Milk, PCR.

GİRİŞ

C.burnetii hücre içine yerleşen, kok-çomak arası pleomorfik, gram negatif bir mikroorganizmadır (1-3). Sığır, koyun ve keçiler *C. burnetii* primer rezervuar konakçılarıdır (4). Hayvanlarla temas eden kişiler, veterinerler, tarım işçileri, mezbaha işçileri ve enfekte hayvanlarla çalışan laboratuvar personeli yüksek risk altındadır (5-7). Hastalığın akut döneminde akciğer, dalak, kan ve karaciğerden sıklıkla izole edilen bakteri, kronik dönemde uterus ve meme bezlerine yerleşmektedir. Kronik Q ateşinin en sık görülen patolojik bulguları arasında abortlar ve ölü doğumlar vardır (2,8). Enfekte hayvanlar bakteriyi çevreye idrar, dışkı, süt ve doğum çıkartıları ile etrafa bulaştırırlar. İnsanlar kontamine aerosollerin solunması ile veya çiğ süt ve süt ürünleri tüketimi ile enfekte olurlar (9,10). Son yapılan çalışmalarda, keçilerin süt yoluyla etkeni attıkları, koyunların ise vajinal mukus ya da dışkı ile dışarı attıkları bildirilmiştir (10-12).

Q humması tanısı genellikle serolojik testler ile yapılmaktadır. Serolojik tanıda mikrooglitinasyon, kompleman fiksasyon testi (KFT), indirekt floresans antikör testi ve ELISA testleri kullanılmaktadır ve IFA tekniği referans metod olarak önerilmektedir (13-15). Ancak serolojik pozitiflik hastalığın bulunduğunu göstermez. Oysa bakteri izolasyonu hastalığın varlığını kesin olarak açıklar. *C. burnetii* izolasyonu uzun, zor ve kültürünün yapılması tehlikeli olduğundan, bu etken izolasyonu için "biyogüvenlik düzey 3" koşula gereksinim duyulmaktadır (16). Laboratuvar muayeneleri için yavru atma veya doğumdan hemen sonra atık yavru, plasenta ve vajinal akıntılar gibi örnekler alınmalıdır. Ayrıca memeden ve süt toplama tanklarından alınan süt, kolostrum veya gaita örnekleri de hastalığın teşhisi için değerlendirilebilecek örneklerdendir (3,17). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), son derece hassas olan ve süt, dışkı ve vajinal svabda bakteri varlığını belirlemede tarama için kullanılan spesifik tespit yöntemidir (5,18,19).

Bu çalışma, Elazığ ve komşu illerden abort öyküsü olan ve olmayan koyun ve keçi sürülerinden toplam 120 adet süt örneği toplanarak, moleküler yöntemlerden biri olan PZR metodu ile *C. burnetii* varlığı açısından araştırılması amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Süt örneklerinden bakteriyel DNA, Berri ve ark. 'larının (19) bildirdiği şekilde bazı modifikasyonlar ile ekstrakte edildi. Bu amaçla laboratuvara getirilen süt örnekleri 3000 g' de 10 dakika süre ile 3 kez santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pelet yıkandı ve 50 ul distile su içinde iki kez yeniden süspansiyon haline getirdi. Daha sonra, DNA ekstraksiyon QIAamp kiti imalatçı firma talimatlarına göre (Qiagen, Hilden, Almanya) süt numuneleri için uygulandı. Laboratuvara getirilen süt örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp DNA kitinde (Qiagen S.A., France) belirtilen prosedüre göre yapıldı. Primer olarak *C. burnetii* suşunun transpozon repetitive bölgesinden türetilen tür spesifik Trans-1 (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCCAGT C-3') and trans-2 (5'-CCC AAC AACACC TCC TTATTC-3') (20) primer çifti kullanıldı. DNA amplifikasyonu 95 °C'de 2 dakika ön ısıtmayı müteakip 5 siklus 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 61 °C'de 30 saniye hibridizasyon, 72 °C'de 1 dakika sentez olmak üzere gerçekleştirildi. Bunu takiben 40 siklus; 94 °C'de 30 saniye, 61 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika olmak üzere ısı işlemleri uygulandı. Son siklus ise 72 °C'de 10 dakika olarak programlandı (21). PCR'de amplifiye edilen DNA, %1.5'luk agaroz jel içerisinde 100 voltta 1 saat süreyle elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforezi mütakip jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) ile boyandı ve sonuçlar UV transilluminatörde değerlendirildi. PCR ürünlerinden elde edilen 687 bp uzunluğundaki bant *C. burnetii* yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 1). Moleküler çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *C. burnetii* referans suşu Dr. Mustapha Berri (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France)' den temin edildi.

BULGULAR

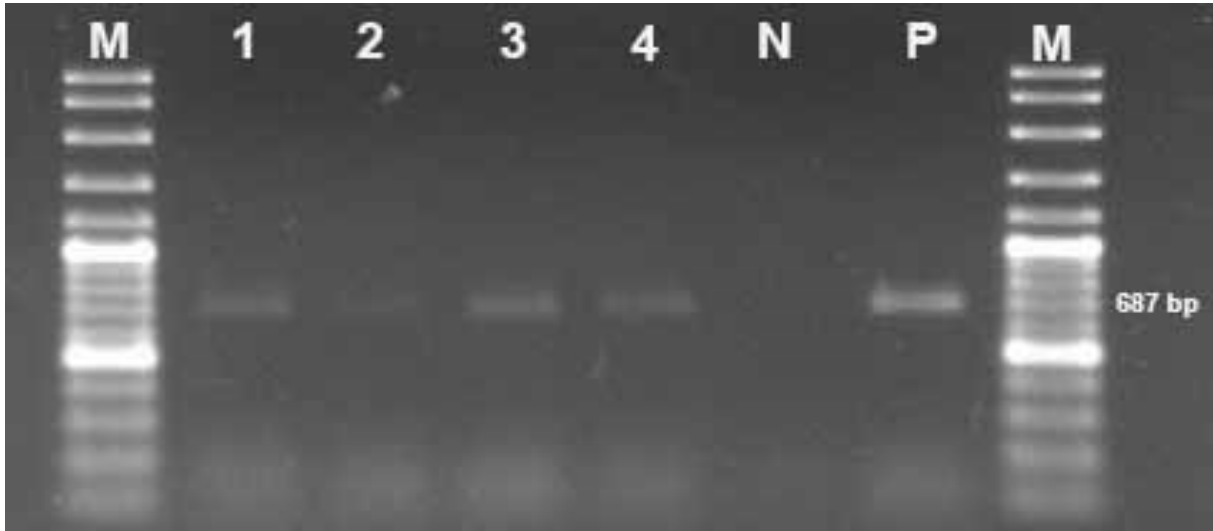
Bu çalışmada Elazığ ve civar illerinde halk elindeki özel üretim yapan işletmelerden abort öyküsü olan koyun ve keçi sürülerinin herbirinden 30 süt örneği, abort öyküsü olmayan koyun ve keçi sürülerinin herbirinden 30 süt örneği olmak üzere toplam 120 süt örneği toplanarak PCR testi ile *C. burnetii* varlığı yönünden incelendi. Bu örnekler, abort ihbarı yapılmış ve sağlıklı koyun ve keçi sürüleri içerisinde tesadüfi örnekleme metodu kullanılarak seçilmiştir. Yapılan incelemelerde abort yapan koyun sürülerinde 3 adet, abort yapan keçi sürülerinde ise 1 adet *C. burnetii* pozitifliği PCR metodu ile tespit edildi (Tablo 1). Abort yapmayan sürülerde (Koyun ve keçi) ise pozitiflik tespit edilmedi. Süt örneklerinden

ekstrakte edilen DNA'nın PCR'de amplifiye edilmesi ve agaraz jel elektroforez işlemine tabi tutulması sonucunda 687 bp uzunluğunda pozitif bantlar elde edildi (Şekil 1).

Tablo1. Abort öyküsü olan ve olmayan koyun ve keçi sütlerinin PCR test sonuçları.

Table 1. The PCR test results of sheep and goat milk samples with history of abortion and without history of abortion.

Abort öyküsü olanlar			Abort öyküsü olmayanlar		
Pozitif			Pozitif		
Süt(Koyun)	n	%	Süt(Koyun)	n	%
30	3	10	30	-	-
Süt(Keçi)	n	%	Süt(Keçi)	n	%
30	1	3.33	30	-	-



Şekil 1. Süt örneklerinden elde edilen *C. burnetii* DNA'sının ethidium bromide ile boyanmış %1.5'lik agaroz jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp DNA ladder, 1, 2, 3, 4: Pozitif örnekler, N: Negatif Kontrol, P: *C. burnetii* Pozitif Kontrol.

Figure 1. Appearance on agarose gel electrophoresis (1.5%) stained with ethidium bromide of *C. burnetii* DNA extracted from the milk samples. M: 100 bp DNA ladder, 1, 2, 3, 4: Positive samples, N: Negative control, P: *C. burnetii* Positive control.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Elazığ ve çevresinde abort yapan ve yapmayan farklı koyun ve keçi sürülerinden alınan toplam 120 süt örneği Trans 1 ve Trans 2 primerleri kullanılarak incelendi ve abort yapan koyun sürülerinde alınan süt örneklerinde %10, abort yapan

keçi sürülerinden alınan süt örneklerinde ise %3.3 oranında PCR metodu ile pozitiflik tespit edildi.

Memelilerde *C. burnetii* süt ile dışarıya çıkarılır ve böylece enfeksiyon kaynağı olarak pastörize edilmemiş süttten yapılan süt ürünleri ve çiğ süttün tüketilmesi başlıca enfeksiyon kaynağı olabilir (16).

Pastörize edilmemiş süttten üretilen çiğ süt veya süt ürünleri fazla miktarda *C. burnetii* içerebilir (22).

Dünyada ve Türkiye'de çoğunlukla *C. burnetii* yaygınlık durumu serolojik çalışmalar yapılarak araştırılmıştır (23). Etkenin moleküler izolasyonu ile ilgili çalışmalar az sayıdadır. Serolojik testler *C. burnetii*'yi dışkı ve süt ile saçan hayvanları belirlemede çok fazla yeterli değildir (4). Ancak hayvanların kan, süt, plasenta, dışkı ve idrar gibi materyallerinden *C. burnetii* izole etmekle enfeksiyon varlığı açıklanabilir (2,24). Mohammed ve ark. (25) tarafından yapılan bir çalışmada farklı hayvan türlerinden elde edilen 148 süt örneğinden 16 örneğin (%10.8), *C. burnetii* DNA'sı pozitif amplifikasyon verdiği ve bu örneklerin 11 tanesinin ineklerde, diğerlerinin ise beş deve de tespit edildiği bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda koyunların genital svab, süt ve dışkı örneklerinde, İran'da pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinde etken tespiti ve kadınlarda aniden oluşan abort vakalarında klinik örneklerde *C. burnetii* doğrudan saptanması için, trans-PCR'in son derece spesifik ve duyarlı olduğu bulunmuştur (22,26,27). İran'ın Kuzey-Doğu'sunda yapılan bir çalışmada 23 koyun sütü örneğinin 8 (%34.78)'inde *C. burnetii* DNA'sı pozitif olarak bulunmuş, ancak 10 keçi sütü numunesinin negatif olduğu tespit edilmiştir (22). Öngör ve ark. (18) 400 koyun süt örneğinde *C. burnetii* varlığını IMS-PCR metodu ile incelemiş ve 14 (%3.5) örnekte pozitif sonuç elde etmişlerdir. Bu çalışmada özellikle abort yapan ve yapmayan koyun ve keçi süt örneklerinden elde edilen %10 ve %3.3'lük oran diğer hayvan türlerine bu etkenin nakli ve insanlara naklinde süt ile saçılımın önemli olduğunu göstermektedir. Yapılan bu çalışma özellikle epidemiyolojik çalışmalarda *Coxiella burnetii* yönünden pozitifliğin bilinmesi, hastalıklı hayvanlarla yakın ilişkide olan insanlara bulaşmasının önlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, Bu çalışmada klinik olarak laboratuvara gönderilen süt örneklerinde *C. burnetii*'yi saptamak için mevcut PCR kitlerinden faydalanılarak, bu etkenin kısa sürede identifiye

edilmesi yönünde kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, Bu çalışmada moleküler teknikler ile Q fever için yapılan taramalarda klinik örneklerde *C. burnetii*'nin hızlı bir şekilde belirlenmesi açısından avantaj sağlanmış olup bu hastalık için kontrol önlemleri alınarak tedaviye başlama sürecinin kısılmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yin MY., Qin SX., Tan QD., Feng SY., Liu GX., Zhbu DH., Zhu XQ., 2015. First report of *C. burnetii* seroprevalence in Tibetan sheep in China. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 15, 419-422.
2. Maurin M., Raoult D., 1999. Q Fever. *Clin Microbiol Rev*, 12, 518-553.
3. OIE (2010). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.1.12. Q Fever.
4. Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Vet Res*, 36, 327-349.
5. Kırcan S., Kaya O., Tekbıyık S., Parın U., 2008. Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. *Turk J Vet Anim Sci*, 32, 215-220.
6. Borriello G., Iovane G., Galiero G., 2010. La febbre Q negli animali domestici. *Large Anim Review*, 16, 273-283.
7. Cetinkaya B., Kalender H., Ertaş HB., Muz A., Arslan N., Öngör H., Gürcay M., 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet Rec*, 146, 131-136.
8. Kim SG., Kim EH., Lafferty CJ., Dubovi E., 2005. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg Infect Dis*, 11, 619-621.
9. Guatteo R., Beaudreau F., Berri M., Rodolakis A., Joly A., Seegers H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res*, 37, 827-833.
10. Rodolakis A., 2009. Q fever in dairy animals. *Rickettsiology and Rickettsial diseases-5th international conference*. *Ann NY Acad Sci*, 1166, 90-93.

11. Muskens J., Wouda W., Von Bannisseht-Wijsmuller T., Van Maanen C., 2012. Prevalence of *Coxiella burnetii* infections in aborted fetuses and stillborn calves. *Vet Rec*, 170, 260-264.
12. Khalili M., Ghobadian Diali H., Norouzian Mirza H., Mosavi SM., 2015. Detection of *Coxiella burnetii* by PCR in bulk tank milk samples from dairy caprine herds in southeast of Iran. *Asian Pac J Trop Dis*, 5, 119-122.
13. Kovacova E., Kazar J., Spanelova D., 1998. Suitability of various *Coxiella burnetii* antigen preparations for detection of serum antibodies by various tests. *Acta Virol*, 42, 365-368.
14. Little TWA., 1983. Q-Fever-an Enigma. *Br Vet J*, 139, 277-283.
15. Reimer LG., 1993. Q-Fever. *Clin Microbiol Rev.*, 6, 193-198.
16. Fournier PE., Marrie TJ., Raoult D., 1998. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol*, 36, 1823-1834.
17. Ho T., Htwe KK., Yamasaki N., 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol Immunol*, 39, 663-671.
18. Öngör H., Cetinkaya B., Karahan M., Açık MN., Bulut H., Muz A., 2004. Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Vet Rec*, 154, 570-572.
19. Berri M., Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., 2003. PCR-based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *Methods Mol Biol*, 216, 153-161.
20. Hoover TA., Vodkin MH., Williams JC., 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol*, 174, 5540-5548.
21. Vaidya VM., Malik SVS., Bhilegaonkar KN., Rathore RS., Kaur S., Barbuddhe SB., 2010. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 307-321.
22. Khanzadi S., Jamshidi A., Razmyar J., Borji SH., 2014. Identification of *Coxiella burnetii* by touch-down PCR assay in unpasteurized milk and dairy products in North-East of Iran. *Iranian J Vet Med*, 8, 15-19.
23. Kalender H., 2001. Elazığ ve komşu illerdeki koyunlarda *Coxiella burnetii* enfeksiyonunun yaygınlığı. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 51-55.
24. Aitken ID., Bogel K., Cracea E., Edlinger E., Houwers D., Krauss H., Rady M., Rehacek J., Schiefer HG., Schmeer N., Tarasevich IV., Tringali G., 1987. Q Fever in Europe: current aspects of aetiology, epidemiology, human infection diagnosis and therapy. *Infection*, 15, 323-327.
25. Mohammed OB., Jarelnabi AM., Aljumaah RS., Alshaikh MA., Bakhiet AO., Omer SA., Alagaili AN., Hussein MF., 2014. *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever in Saudi Arabia: molecular detection from camel and other domestic livestock. *Asian Pac J Trop Med*, 412-420.
26. Berri M., Laroucau K., Rodolakis A., 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 15, 285-293.
27. Vaidya VM., Malik SV., Kaur S., Kumar S., Barbuddhe SB., 2008. Comparison of PCR, immunofluorescence assay and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. *J Clin Microbiol*, 46, 2038-2044.