



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**EGE BÖLGESİNDE RUMİNANT
ABORTUSLARINDA *Coxiella burnetii*'nin
YAYGINLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Eylem ŞEN YÜKSEL

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**EGE BÖLGESİNDE RUMİNANT
ABORTUSLARINDA *Coxiella burnetii*'nin
YAYGINLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Eylem ŞEN YÜKSEL

Danışman : Prof.Dr. Güven ÖZDEMİR

Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Doktora Programı

İzmir
2020

Eylem ŞEN YÜKSEL tarafından doktora tezi olarak sunulan “Ege Bölgesinde Ruminant Abortuslarında *Coxiella burnetii*’nin Yaygınlığının Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 21.05.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR
Raportör Üye : Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR
Üye : Prof. Dr. Ataç UZEL
Üye : Prof. Dr. Hacı Halil BIYIK
Üye : Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “ Ege Bölgesinde Ruminant Abortuslarında *Coxiella burnetii*’nin Yaygınlığının Araştırılması ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

21 / 05 / 2020

Eylem ŞEN YÜKSEL

ÖZET

EGE BÖLGESİNDE RUMINANT ABORTUSLARINDA *Coxiella burnetii*'nin YAYGINLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ŞEN,YÜKSEL, Eylem

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

Mayıs 2020, 100 sayfa

Bu tez çalışmasında; Ege Bölgesi'nin yedi ilinden (İzmir, Aydın, Denizli, Muğla, Manisa, Kütahya, Uşak) Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gelen 100 adet koyun, keçi ve sığır aborte fetüs örneği, *Coxiella burnetii* yaygınlığının kantitatif olarak ortaya koyulması için moleküler yöntemler ile analiz edilmiştir.

Konvansiyonel PCR yöntemi ile; sığır aborte fetüs örneklerinde 1 adet (%2,85), koyun aborte fetüs örneklerinde 4 adet (%9,75) ve keçi aborte fetüs örneklerinde 4 adet (%16,6) olmak üzere toplam 9 adet örnek pozitif olarak saptanmıştır. Real-time PCR yöntemi ile; sığır aborte fetüs örneklerinde 1 adet (%2,85), koyun aborte fetüs örneklerinde 6 adet (%14,6) ve keçi aborte fetüs örneklerinde 8 adet (%33,3) olmak üzere toplam 15 adet örnek pozitif olarak saptanmıştır. Kantitatif PCR (qPCR) ile pozitif örneklerde *C.burnetii* hedef DNA kopya sayıları belirlenmiştir ve 2×10^1 ila $5,54 \times 10^5$ gen kopya sayısı / 5 mg değerleri arasındadır.

Çalışma sonuçları; ruminant aborte fetüs örneklerinde *C.burnetii* varlığının saptanmasında, Real-time PCR yönteminin Konvansiyonel PCR'a göre çok daha duyarlı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca qPCR; ruminant aborte fetüsleri yoluyla *C.burnetii* saçılımının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılabilecek oldukça hassas ve güvenilir bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: *C. burnetii*, aborte fetüs, qPCR, Real time-PCR



ABSTRACT**INVESTIGATION OF *Coxiella burnetii* PREVALENCE OF ABORTION IN RUMINANTS IN THE AEGEAN REGION**

ŞEN,YÜKSEL, Eylem

PhD in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

May 2020, 100 pages

In this study; 100 sheep, goat and cattle aborted fetus samples these coming from seven provinces of the Aegean Region (İzmir, Aydın, Denizli, Muğla, Manisa, Kütahya, Uşak) to the Bornova Veterinary Control Institute, was examined by molecular methods to demonstrate the prevalence quantitatively of *Coxiella burnetii*.

According to the Conventional PCR method; A total of 9 samples were positive, 1 (2.85%) in bovine aborted fetus samples, 4 (9.75%) in sheep aborted fetus samples and 4 (16.6%) in goat aborted fetus samples. According to Real-time PCR method; A total of 15 samples were positive, 1 (2.85%) in cattle aborted fetus samples, 6 (14.6%) in sheep aborted fetus samples and 8 (33.3%) in goat aborted fetus samples. In the positive samples with quantitative PCR (qPCR) method the target DNA copy numbers of *C.burnetii* were determined and ranged from 2×10^1 to 5.54×10^5 gene copies / 5mg values.

Study results; for revealing the presence of *C.burnetii* in ruminant aborted fetus samples, indicates that Real-time PCR method is much more sensitive than Conventional PCR. Also qPCR method; It is a sensitive and reliable method that can be used to quantitatively determine *C.burnetii* shedding in through ruminant aborted fetuses way.

Keywords: *C. burnetii*, aborted fetus, qPCR, Real-time PCR

ÖNSÖZ

Q ateşi; endemik ya da sporadik vakalar halinde tüm dünyada yaygın bir enfeksiyondur. Uzun yıllar Q ateşi'nin; sporadik ve bölgesel olarak kısıtlanmış bir enfeksiyon olduğu düşünülmüştür. Ancak; *C.burnetii* hakkında kaydedilen ilerleme sayesinde birçok ülkede raporlanabilir bir enfeksiyon haline gelmiş, biyoterör ajanı olarak nitelendirilmiştir. Bu gelişmeler enfeksiyonun daha önce düşünülenenden daha yaygın olduğunu ortaya koymaktadır. Ortadoğu'da yaşanan son savaş, tropikal bölgelerde yapılan yoğun çalışmalar ve son olarak Hollanda'da yaşanan büyük salgın Q ateşi'nin büyük bir halk sağlığı problemi olabileceğini göstermiş, birçok ülkede enfeksiyona ilişkin yeni kontrol programları geliştirilmesine önderlik etmiştir.

Hastalığın etkeni *Coxiella burnetii*; geniş yelpazede hayvan rezervuarının iştirak ettiği çoklu enfeksiyon döngüsü, bulaştırıcı kaynaklarının çeşitliliği, henüz tam olarak aydınlatılamamış hücre içi biyolojik döngüsü, spor benzeri yapılar ile çevresel şartlara dirençliliği, persiste enfeksiyon oluşturma becerisi ile dikkat çekici bir virülan mikroorganizma profili çizmektedir. Q ateşi; ülkemizde üzerinde çok fazla çalışılmamış, bugüne kadar göz ardı edilmiş, hayvan ve insanlardaki epidemiyolojisi tam anlamı ile ortaya konulmamış, önemli bir zoonotik enfeksiyondur. Hayvan ve insan sağlığı problemi olmasının yanı sıra bir biyoterör ajanı olarak taşıdığı riskler göz önüne alındığında; bu zorlu patojenin ülkemizdeki yaygınlığına ilişkin tabloya katkı sağlayacak çalışmalar önem arz etmektedir. Q ateşi enfeksiyonuna ilişkin mevcut bilgiler ve ihtiyaçlar ışığında planlanan bu çalışmada; Ege Bölgesinde, büyük ve küçük ruminantlar tarafından *C.burnetii* saçılımının moleküler yöntemler ile kantitatif olarak belirlenmesi ve bu saçılımın neden olduğu çevresel bulaşma, hayvan sağlığı ve halk sağlığı risklerine dikkat çekilmesi hedeflenmiştir.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 İsimlendirme ve Tarihçe	3
2.2 Epidemiyoloji	4
2.3 Bakteriyolojik Özellikler	8
2.3.1 Morfoloji.....	8
2.3.2 Genomik özellikler ve tiplendirme çalışmaları	9
2.3.3 Asit ortama adaptasyon ve metabolizma	13
2.3.4 Faz varyasyonu	14
2.4 Patogenez ve Patoloji	15
2.4.1 Hücreye giriş.....	16
2.4.2 Hücre içinde parazitik vakuol gelişimi	16
2.4.3 Olgunlaşmış parazitik vakuol	18
2.4.4 Patolojik bulgular	21

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5 Q Ateşinde Bağışıklık	23
2.5.1 Doğal bağışıklık	24
2.5.2 Edinilmiş bağışıklık	26
2.6 Klinik Bulgular	29
2.7 Teşhis Yöntemleri	32
2.8 Tedavi	35
2.9 Korunma	36
2.10 Ülkemizde Q Ateşi	37
3.GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1 Gereç	39
3.1.1 Çalışmada kullanılan örnekler	39
3.1.2 Kullanılan kimyasallar, boyalar, tamponlar	41
3.1.3 Kullanılan besi yerleri	42
3.1.4 Standart suşlar	44
3.1.5 DNA ekstraksiyonu	44
3.1.6 DNA amplifikasyonu	44
3.1.7 Kullanılan cihazlar	45
3.2 Yöntem	46
3.2.1 Örneklerin DNA ekstraksiyonu için hazırlanması	46
3.2.2 DNA ekstraksiyonu	46
3.2.3 Konvansiyonel PCR çalışmaları	47
3.2.4 Real-time PCR için tespit limiti (LOD) çalışmaları	49

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.5 Kantitatif Real-time PCR çalışmaları	54
3.2.6 Dizileme analizi ile çalışmanın verifikasyonu.....	55
4. BULGULAR	56
4.1 DNA İzolasyonu, Konvansiyonel PCR, Real-time PCR Bulguları.....	56
4.1.1 Konvansiyonel PCR bulguları	56
4.1.2 Real-time PCR bulguları	57
4.1.3 Tespit limiti (LOD) bulguları	59
4.2 Kantitatif Real-time PCR bulguları	59
4.3 Dizileme Çalışması Bulguları.....	60
5.TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
TEŞEKKÜR	97
ÖZGEÇMİŞ.....	99



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 <i>C.burnetii</i> 'nin enfeksiyon şeması.....	20
Şekil 2.2 <i>C.burnetii</i> 'nin PV içerisindeki morfolojik gelişim formlarının elektromikroskopik görüntüsü.....	20
Şekil 2.3 <i>C.burnetii</i> ile enfekte olmuş plasenta.....	22
Şekil 2.4 Q ateşi enfeksiyonunda kemik iliğinde 'Donut granülomlar'.....	23
Şekil 3.1 <i>IS1111</i> gen bölgesine ait plazmit standartının farklı konsantrasyonlardaki amplifikasyon eğrisi	52
Şekil 3.2 <i>IS1111</i> gen bölgesine ait standart eğri	53
Şekil 3.3 <i>İcd</i> gen bölgesine ait plazmit standartının farklı konsantrasyonlardaki amplifikasyon eğrisi	53
Şekil 3.4 <i>İcd</i> gen bölgesine ait standart eğri.....	53
Şekil 4.1 10, 12, 13 numaralı keçi 11 ve 17 numaralı koyun örneklerine ait jel görüntüsü	57
Şekil 4.2 22, 51, 78 numaralı keçi; 62, 65 numaralı koyun örneklerinin <i>IS1111</i> gen bölgesi spesifik Real-time PCR amplifikasyon eğrisi.....	58
Şekil 4.3 12 numaralı keçi örneğinin <i>icd</i> spesifik Real-time PCR amplifikasyon eğrisi	59



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 Aborte fetüs iç organ örneklerine ilişkin bilgiler.....	39
Tablo 3.2 Konvansiyonel PCR analizinde kullanılan primerler	44
Tablo 3.3 Real-time PCR analizinde kullanılan <i>IS1111</i> gen bölgesine spesifik primer ve proplar	45
Tablo 3.4 Real-time PCR analizinde kullanılan <i>icd</i> gen bölgesine spesifik primer ve proplar	45
Tablo 3.5 Konvansiyonel PCR çalışmasında reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	48
Tablo 3.6 Konvansiyonel PCR termal şartları	48
Tablo 3.7 Ligasyonda kullanılan bileşenler ve miktarları	50
Tablo 3.8 Real-time PCR reaksiyon bileşenleri.....	54
Tablo 3.9 Real-time PCR reaksiyon şartları	55
Tablo 4.1 DNA izolasyonu, konvansiyonel ve Real-time PCR sonuçları	56
Tablo 4.2 Plazmit standartları kullanılarak PCR kantifikasyonuna göre hedef gen kopya sayıları	60

xx



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

Açıklama

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
PCR	Polimerase Chain Reaction/Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Real-time PCR	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif Polimerase Zincir Reaksiyonu
DNaz	Deoksiribonükleaz
RNaz	Reoksiribonükleaz
bç	Baz çifti

Simgeler

Açıklama

ml	Mililitre
L	Litre
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
g	Gram
ng	Nanogram
pH	Powder of Hydrogen
sn	Saniye
dk	Dakika
pmol	Pikomol
µm	Mikromolar



1. GİRİŞ

Coxiella burnetii; Antarktika ve Yeni Zelanda hariç tüm dünyada yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. Evcil ve vahşi memeli hayvanlar, kuşlar, sürüngenler, keneler, balıklar, artropotlar gibi çok çeşitli konakçılarda bulunabilen etken; insan ve hayvanlarda görülen Q ateşi enfeksiyonuna sebep olmaktadır. Çiftlik hayvanları; *C.burnetii* epizootik döngüsünün merkezinde yer alarak, insanlara bulaşmada temel rezervuar rolünü üstlenir (Maurin, 1999). Hayvanlarda abort ve infertilite gibi reproduktif problemlerle seyreden enfeksiyon; insanlara temel olarak aerosol yolla bulaşmakta, akut enfeksiyondan öldürücü kronik enfeksiyonlara kadar değişen farklı klinik tablolarda seyretmektedir. Akut enfeksiyon; ateşle birlikte grip benzeri belirtiler, pnömoni ya da hepatitis ile seyrederken, daha az sıklıkta görülen ve mortalite oranı yüksek olan kronik formda endokardit ortaya çıkmaktadır. Kronik tablo özellikle immunsupresif insanlar için uzun vadede kalıcı enfeksiyon riski taşımaktadır (Dupont et al., 1992). *C.burnetii*'nin yüksek enfeksiyözitesi, hastalığın yayılımında en temel faktördür. Ayrıca; spor benzeri formu ile zor çevresel koşullara son derece dirençli, hava ve rüzgar yoluyla yayılımı hızlı, aerosol halde üretilip uygulanması kolay ve çevreden elimine edilmesi oldukça zaman alıcıdır. Bireyler arasında kısa sürede salgın oluşturabilir, enfekte kişileri özellikle kronik formda uzun süreli antibiyotik tedavi süreçleri ile karşı karşıya bırakabilir. Bütün bu özellikleri ile *C.burnetii* 1942 yılından itibaren potansiyel biyolojik silah olarak değerlendirilmiştir (Bielawska et al., 2003). Biyolojik silah olarak kullanılma potansiyeline sahip olan önemli mikroorganizmalar ve toksinleri, ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) tarafından üç bölümde sınıflandırılmıştır. Kategori A ajanlar; yüksek mortalite ve morbidite ile seyreterek toplumda paniğe neden olabilir, ulusal güvenlik ve toplum sağlığı için risk taşır ve korunma için özel hazırlık gerektirir. Kategori B ajanlar, yüksek morbidite ve düşük mortaliteye neden olmaktadır. Kategori C ajanlar ise, kolay elde edilebilir ve üretilebilir olmaları ile potansiyel olarak yüksek morbidite ve mortalite şekillendirebilir ve halk sağlığını tehdit etme potansiyeli taşır. Kategori A ajanlar arasında *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Clostridium botulinum* toksini bulunmaktadır. Kategori

B; *C.burnetii*'nin de içerisinde olduğu *Brucella* türleri, *Salmonella* türleri, *Escherichia coli* O157:H7, *Rickettsia prowazekii*, *Vibrio cholera*, *Burkholderia mallei*, viral hemorajik virüsler gibi ajanları içerir. Kategori C'de çoklu ilaç direnci gösteren *Mycobacterium tuberculosis*, *Nipavirus*, *Hantavirus*, Sarı ateş virusu gibi ajanlar yer almaktadır (Anonim).

Q ateşi enfeksiyonu genel olarak bir meslek hastalığı olarak değerlendirilmektedir. Ancak etkenin yüksek enfeksiyöz özelliği ve rüzgar ile kilometrelerce uzağa taşınabilmesi; hayvanlarla direk teması olmayan kentsel alanlarda yaşayan kitleler için de büyük risk oluşturmaktadır. Ayrıca, Kategori A ajanlar gibi yüksek ölüm oranlarına sebep olmasa da, *C.burnetii* ile yapılan bir biyoterör saldırısının kalıcı enfeksiyon riski nedeni ile uzun vadeli sonuçları olabilir. Q ateşi; (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organization for Animal Health-OIE), Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO), Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization –WHO), Avrupa Hastalık Önleme Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority-EFSA) tarafından 'Günümüzde önemi gittikçe artan hastalıklar' kapsamında değerlendirilmektedir (Anonim).

Hastalığın teşhisi; hem ülke hayvancılığı hem de riskli bir zoonoz olması sebebiyle insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Ülkemizde enfeksiyonun tanımlanmasından itibaren yapılan çalışmalar; çoğunlukla çiftlik hayvanları üzerinde yoğunlaşmıştır ve serolojik düzeydedir. Seroloji geçmişte enfeksiyona maruz kalmayı göstermekle birlikte, enfeksiyon kaynağı hayvanları tespit etmede verimsiz kalmaktadır. Ülkemizde epidemiyolojik veri halen azdır. Bu tez çalışmasında; Q ateşi hastalığının etkeni *C.burnetii*'nin varlığının ve yaygınlığının temel konakçıları olarak rol oynayan çiftlik hayvanlarında moleküler yöntemlerle tespiti hedeflenmiştir. Böylece çiftlik hayvanları tarafından *C.burnetii*'nin saçılımı kantitatif olarak ortaya koyularak; enfeksiyonun hayvan ve insan popülasyonları için taşıdığı riski belirlenmesi, ülkesel epidemiyolojik tabloya katkıda bulunulması ve Q ateşi hastalığı ile mücadele ve kontrol programlarına ilişkin ülkesel olarak geliştirilecek koruma ve kontrol önlemlerine ışık tutacak veriler sunulması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

‘Q Fever’ terimi ilk kez 1935 yılında Avustralya’da mezbaha işçilerinde ortaya çıkan, gribe benzeyen belirtilerle seyreden ateşli hastalığı tanımlamak için Derrick adlı araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Başlangıçta, daha önce bilinen hastalıklar ile klinik benzerlik göstermediği için bu hastalığa Query (soru, bilinmeyen) kelimesinden esinlenerek ‘şüpheli ateş’ anlamına gelen ‘Q Fever’ adı verilmiştir. Ateşli hastaların kan ve idrar örnekleri ile kobaylarda deneysel enfeksiyon oluşturulmuş, ancak etken izole edilememiştir (Derrick, 1937). Burnet ve Freeman adlı araştırmacılar ise Derrick’in enfekte kobay dalak örneklerini farelere vererek ateşli hastalık oluşturmuş ve *Rickettsia burnetii* ismini verdikleri etkeni izole etmişlerdir (Burnet et al., 1937).

Avustralya’da bu gelişmeler yaşanırken; Cox ve Davis adlı araştırmacılar ABD Nine Mile bölgesinde topladıkları kenelerden izole ettikleri etkene *Rickettsia diasporica* ismini vermişlerdir. Cox, 1939 yılında etkeni embriyolu tavuk yumurtasında üretmiştir. Bu dönemde enfeksiyona yakalanan laboratuvar çalışanının kanı ile kobaylarda enfeksiyon oluşturulmuş böylece etkenin insanlar için de patojen olduğu anlaşılmıştır. ABD’deki bu çalışmalar sonucunda ‘nine mile serotipi’ ortaya çıkmıştır (Cox, 1939). Dyer adlı araştırmacı Avustralya’da insanlarda Q Humması olarak tanımlanan ve ABD’de kenelerden izole edilen bakterinin aynı olduğunu ortaya koymuştur. Aynı dönemlerde farklı coğrafyalarda bakteriyi izole eden Cox ve Burnet’in isimlerine atfedilerek, etken *Coxiella burnetii* olarak isimlendirilmiştir (Madariaga et al., 2003).

C.burnetii, zorunlu hücre içi yaşam şekli ve kenelerle ile olan bağlantısı nedeniyle *Rickettsia* ve *Rochalimea* genusu, *Rickettsiaceae* familyasının *Rickettsia* takımı içinde bulunan *Proteobacteria*’ların α -1 alt grubunda sınıflandırılmıştır (Weiset et al., 1984). Ancak 16S rRNA sekans analizi temelli filogenetik araştırmalar ile taksonomik sınıflandırılması değiştirilmiş ve *Rickettsia* grubundan çıkarılmıştır. *Coxiella* genusunun, *Proteobacteria*’ların γ alt grubunda *Legionellales* takımında, *Coxiellaceae* familyasında yer aldığı ve *Legionella*, *Franciella* ve *Rickettsiella* cinsleri ile akrabalığı bulunduğunu ortaya koyulmuştur

(Stein et al., 1993). *Coxiella* genusunda bulunan diğ er bir tür; Tan ve Owens (2000) tarafından Avustralya’da kerevitlerden izole edilen ve *C.burnetii* ile %95,5 oranında genetik benzerlik gösteren *Coxiella cheraxi*’dir. Son yıllarda; Tam Genom Dizilimesi (WGS)  alışmaları sonucunda ortaya koyulmuş, birçok kene türünde simbiyotik bir yaşam süren ve genetik çeşitlilik gösteren *Coxiella* benzeri mikroorganizmalardan (CLB) bahsedilmektedir. Muhtemelen *C.burnetii*’nin yeni virülans özellikleri kazanarak bu mikroorganizmalardan omurgalı hücrelerini enfekte edebilme potansiyeline evrimleştiğı düşünülmektedir (Duron et al., 2015a).

2.2. Epidemiyoloji

Tüm dünyaya yayılım, rezervuar ve vektör  eşitliliğı ile bütün bu faktörler arasındaki dinamik etkileşimlerin tanımlanmasındaki çalışmaların eksikliğı nedeniyle Q ateşinin epidemiyolojisi karmaşıktır. *C.burnetii*’nin sebep olduğı Q ateş, tüm dünyada yaygın zoonotik bir enfeksiyondur. Evcil ve yabani memeler, artropotlar, kuşlar, balıklar ve sürüngenler dahil çok geniş yelpazede hayvan türünden izole edilmiştir. 2016 yılından itibaren OIE tarafından çoklu hayvan türü hastalıkları arasında kategorize edilmiştir (Anonim). Ancak enfeksiyonun insanlara bulaşmasında temel rezervuarlar koyun, keçi ve sığırlardır. Hayvanlarda klinik belirti vermeyen Q ateş; abort (yavru atma), metrit, zayıf veya  l  yavru doğıumu, infertilite gibi reproduktif problemlere neden olması sebebiyle aynı zamanda bir hayvan sağılığı problemidir. Prevalansın  iftlik hayvanlarında oldukça yaygın olduğı bildirilmiştir (Sığır, koyun-keçi sürüleri düzeyinde sırası ile %37,7 ve %25). *C.burnetii*; temel olarak enfekte çiftlik hayvanların plasenta, yavru zarları gibi doğıum atıkları ile ayrıca vajinal mukus, dışkı, idrar ve sütleri ile saçılmaktadır. Enfekte plasenta ve f tal sıvının oldukça yüksek miktarda (10^9 /g) bakteri i erdiğı belirtilmiştir. Bu nedenle doğıum ürünleri, mera ve toprakların kontaminasyonunda en önemli faktördür (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Guatteo et al., 2011).

Evcil ruminantların enfeksiyonları  oğıunlukla yavrulama dönemleri ile bağılantılıdır. En yüksek abort oranları keçilerde gözlenmektedir. Enfekte hayvanlar abort yaptıktan uzun bir süre boyunca etkeni saçmaya devam ederler. Doğıum sonrası iki hafta, saçılım en yüksek düzeydedir (Woldehiwet, 2004).

Epidemiyolojik veriler; süt ineklerinin koyunlardan çok daha fazla sıklıkta kronik enfekte olduklarını ve abort yapsın ya da yapmasın, daha uzun süre sütleri ile *C. burnetii* saçtıklarını ve bu nedenle en önemli insan enfeksiyonu kaynağını temsil ettiklerini göstermektedir. Yapılan çalışmalar; süt ineklerinin dışkı ile on dört gün, süt ile on üç aya kadar; koyunların vajinal mukusla yetmiş bir gün, dışkı ve süt ile sekiz gün; keçilerin ise bir günden altı haftaya kadar etkeni saçabildiklerini ortaya koymaktadır (Arricau-Bouvery and Rodolakis 2005; Guatteo et al., 2006; Rodolakis et al., 2007).

Kedi ve köpekler de *C. burnetii*'nin önemli rezervuarlarıdır. Köpekler; kene ısırığı, kontamine plasenta ve süt tüketimi yanısıra, vahşi hayvanlarla temas sonucu aerosol yol ile de enfekte olabilirler. Kanada'da gebe enfekte kedi ve köpek ile temas sonucu sporadik Q ateşi vakaları raporlanmıştır. Kuşların göçü de, enfeksiyonun uzak bölgelere taşınmasında etkilidir. Son araştırmalar *C. burnetii*'nin amip içerisinde 6 ay kadar canlı kalabildiğini ve doğada amipin önemli bir rezervuar olabileceğini göstermektedir (Maurin, 1999).

Kenelerin Q ateşi enfeksiyonunun doğal döngüsünde rolleri mühim olmakla birlikte temel bir gereklilik değildir. *C. burnetii*'nin epizootik döngüsünde herhangi bir vektör spesifikliği bulunmamaktadır. *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* ve *Dermacentor* türleri başta olmak üzere kırktan fazla kene türü *C. burnetii* ile enfektendir. Birçok hayvanda enfeksiyondan sonra geçici bir bakteriyemi gelişir, böylece keneler beslenme esnasında *C. burnetii* ile enfekte olurlar. Bakteri enfekte kenenin mide ve bağırsağında gelişir ve keneler beslenme sırasında dışkı ile hayvan konağa *C. burnetii* bırakırlar. Kenede *C. burnetii*, faz 1 formunda ve oldukça bulaşıcıdır. Keneler aynı zamanda yabani kuş, kemirgen ve vahşi omurgalılara aynı zamanda bu hayvanlardan evcil hayvanlara bulaşmada etkili olurlar. Hayatları boyunca enfekte olan keneler, transovarian yol ile etkeni nesilden nesile aktarır. Kene kaynaklı insan Q ateşi enfeksiyonu nadiren bildirilmiştir (Waag, 2007; Chmielewski et al., 2013).

İnsan enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, genel olarak bakterinin hayvan rezervuarlarındaki dolaşımını yansıtır ve çoğunlukla enfekte çiftlik hayvanları ve onların doğum, abort ürünleri ve doğum sonrası periyodu ile ilişkilendirilmektedir. Koyun ve keçilerin kırkım ve doğum mevsimi olan ilkbahar

ve yazın başında insan enfeksiyonları da artmaktadır. Ancak etkenin çevresel koşullara direnci ve rüzgar ile taşınabilme özelliği; kentsel alanlarda hayvan ile temas öyküsü bulunmayan vakaları açıklamaktadır. Fransa'nın Marseille bölgesinde etkili olan 'mistral' adı verilen rüzgarların; bölgede Q ateşinin hiperendemik vakalar halinde devam etmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Dupont et al., 1999; 2004).

İnsanlar temel olarak; enfekte hayvanlara ait kontamine plasenta ve vücut sıvıları gibi temel kaynağın kurumasından sonra oluşan tozun aerosol yolla alınması ile enfekte olmaktadır. Hollanda'da yapılan bir çalışmada (Bruin et al., 2011) koyun ve keçi çiftliklerinden alınan yüzey svaplarının, bu hayvanların vajinal svaplarına oranla çok daha yüksek miktarda *C.burnetii* DNA'sı içerdiği belirlenmiştir. Etken toz içerisinde 4 ay, aerosollerde ise iki hafta canlı kalabilmektedir ve enfeksiyözitesi oldukça yüksektir. 1-10 arası bakteri bile enfeksiyona neden olabilir. Pastörize edilmemiş çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan sindirim yoluyla bulaşma ikincil öneme sahiptir ve hala tartışmalıdır. Kanada'da enfekte keçi sütünden yapılan peynir tüketimine bağlı ortaya çıkan salgın nadiren de olsa süt ve süt ürünlerine bağlı enfeksiyon ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Çiğ sütte 70°C/15 saniye yüksek ısı pastörizasyonu mutlaka uygulanması gerektiği belirtilmektedir. (Kılıç ve Çelebi, 2008; Bielawska et al., 2013; Günaydın ve Müştak, 2013).

Direk temas ve deri bir diğer bulaşma yoludur. Kontamine dokular; kontamine yün, saman, giysiler; kene dışkısı ile direk ve dolaylı temas aracılığı ile hayvandan hayvana, hayvandan insana, kene dışkısından insana ve hayvana bulaşma da mümkündür. Kişiden kişiye bulaşma çok nadirdir. Enfekte kadınların doğum ürünleri obstetrik servislerde enfeksiyon kaynağıdır. Otopsi sonrası kontamine olmuş aerosoller ile insandan insana bulaşma vakaları bildirilmiştir. Kan transfüzyonu ile bulaşma mümkündür. Enfeksiyonun cinsel yolla geçişi farelerde deneysel olarak gösterilmiştir. Kadın-erkek arası geçişe ilişkin, Avustralya'dan bir vaka ile Irak'tan dönen bir Amerikan askerinin eşine enfeksiyon bulaştırdığı olay rapor edilmiştir (Fournier et al., 1998; Pexara et al., 2018).

Q ateşi; çiftlik çalışanları; mezbahane, et paketlenme, post ve yün işleme sektöründe çalışanlar ve laboratuvar personellerinin risk altında olduğu bir meslek hastalığı olarak değerlendirilmektedir. Ancak; olasılıkla rüzgarla uzak alanlara taşınabilme özelliği ile ilişkili olarak, Avrupa ülkelerinde kentsel alanlarda Q ateşi vakalarının daha sık görülmesi, hastalığın epidemiyolojisinde belirgin bir değişimi ortaya koymakta ve kentsel alan popülasyonlarında giderek artan riske işaret etmektedir (Madariaga et al., 2003).

Enfeksiyonun 1937 yılında Avustralya'da tanımlanmasının ardından, epidemiyolojik özellikleri coğrafi bölgeye göre değişmekle birlikte, sporadik, endemik ya da hiperendemik salgınlar halinde tüm dünyada yaygın olarak görülmüştür. Q ateşi ile ilgili en çarpıcı epidemiyolojik profillerden üçü Afrika, Fransız Guinana bölgesi ve Hollanda'da yaşanmıştır (Eldin et al., 2017).

Afrika'da Q ateşi; ilk kez 1955'de dokuz ülkede ortaya koyulmuş ve seroprevalans giderek artmıştır. Kırsal Afrika'da evsel ruminantların önemli rezervuarlar olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar halen kıtada enfeksiyonun oldukça yaygın olduğu ve *C.burnetii*'nin *Streptococcus pneumoniae* ve *Mycoplasma pneumoniae* ile birlikte yaygın bir pnömoni etkeni olduğunu göstermektedir (Vanderbug et al., 2014).

Güney Amerika'da; büyük bölümü yağmur ormanları ile kaplı Fransız deniz aşırı toprağı olan Guiana bölgesinde, dünyada bildirilen en yüksek prevalans olan, %24 insan pnömoni oranının tecrübe edildiği salgın yaşanmıştır. İlk vaka 1955 yılında bir mezbaha işçisinde tespit edildikten sonra enfeksiyon; özellikle ormanlara yakın yerleşim alanlarında 1996'ya dek giderek artan bir insidens göstermiştir. Bölgede çiftlik hayvanları ve pet hayvanlarında belirlenen düşük seroprevalans, yarasa ve keseli memelilerin sorumlu bulaş kaynakları olabileceğini düşündürmüştür (Epelboin et al., 2012).

Hollanda; 2007-2010 yılları arasında bugüne kadar bildirilen en büyük Q ateşi salgını ile karşı karşıya kalmıştır. Ülkede artan keçi popülasyonu ve hayvan ithalatına paralel olarak; salgın daha önce düşük seroprevalans yaşanan bölgelerde, keçi çiftliklerinde yaşanan abort fırtınaları sonrası ortaya çıkmıştır. Mesleki maruz kalma %3 dolaylarında kalmıştır. Salgında en sık yapılan tanı pnömoni olmuştur ve daha az oranda endokardit ve hepatit vakaları görülmüştür.

4000'den fazla kişinin etkilendiği bu salgının aniden ortaya çıkması ve yayılımı; Q ateşi'nin yüksek sayıda kalıcı enfeksiyonlarının potansiyel gelişimi gibi uzun vadeli halk sağlığı sonuçları yaratması açısından büyük endişe kaynağı olmuştur (Dijkstra et al., 2012).

2.3 Bakteriyolojik Özellikler

2.3.1 Morfoloji

C.burnetii; gram negatif, küçük (0.2-0.4 µm eninde ve 0.4-1.0 µm boyunda) pleomorfik kokobasil formunda, hareketsiz, kapsülsüz bir mikroorganizmadır. Zorunlu intrasellüler üreme özelliği gösterir (Drancourt and Raoult, 2005). Hücre duvarı; peptidoglikan, lipolisakkarit, lipoprotein ve protein içeriği açısından diğer gram negatif bakterilere benzer bir yapı göstermesine rağmen gram boyama ile değil Gimenez yöntemi ile daha iyi boyanır (Amano et al., 1984; Gimenez, 1964).

C.burnetii; ökaryotik monosit ve makrofajların fagolizozomal vakuolleri içerisinde süregelen; hücre morfolojisi, büyüklük ve çevresel koşullara direnç açısından farklılık gösteren hücre tiplerinin oluşturulduğu karmaşık bir intrasellüler yaşam döngüsü sergilemektedir. İki farklı hücre tipinin yer aldığı bu bifazik yaşam şekli, etkenin doğada sürekli canlı ve enfeksiyöz kalmasının temelini oluşturur. Bunlardan küçük hücre varyantı (SCV); durağan faz formudur. Bakteriye ekstrasellüler ortamda uzun süre canlı kalabilme ve zor çevresel koşullara dayanabilme özelliği kazandıran, ökaryotik konakçı hücrenin karşılaştığı bulaşıcı hücre tipidir. Buna karşın metabolik olarak aktif büyük hücre varyantları (LCV); bakteriye konakçı hücrenin asidik fagozomal vakuollerinde replike olma imkanı verir (Sandoz et al., 2016). İlk kez Davis ve Cox 1938'de iki farklı hücre tipinden bahsetmişlerdir. McCaul ve Williams, 1981'de elektron mikroskobu çalışmaları ile SCV ve LCV hücreleri ile vejetatif ve sporojenik farklılaşmayı içeren yaşam döngüsünü açıklamışlardır. LCV hücreleri; 1µm büyüklüğünde, pleomorfik, gevşek nükleotid yapılı ve çoğunlukla kromatinleri sitoplazmaya dağılmış halde görünürler. Sitoplazmik membran, periplazmik boşluk, dış membran proteinleri, hücre duvarındaki peptidoglikan içeriği gibi öğeler açısından tipik bir Gram negatif bakteri morfolojisine sahiptir. SCV hücreleri ise; 0.2 - 0.5 µm büyüklüğünde, çomak şeklinde, LCV hücrelerine kıyasla hücre

duvarında daha kalın ve yoğun bir peptidoglikan tabakasına, küçük periplazmik alana, yoğun kromatine ve çok sayıda sitoplazmik membrana sahip hücre tipidir. Spor benzeri form olarak nitelendirilen SCV'ler; yine LCV'lerden farklı olarak periplazmik boşluğunda protein yapıda yoğun bir materyal içerir (McCaul et al., 1991). Ayrıca; Heinzen (1996) tarafından SCV'lerin, ökaryotik histon H1'e benzerlik gösteren ve *Hq1* adı verilen DNA bağlayıcı proteini içerdiği, kromozomal DNA'nın bu proteinle sıkıştırılıp korunduğu ortaya koyulmuştur. Çift iplikçikli DNA'yı bağlayan *ScvA* proteini de, yoğun kromatin yapısı ve fonksiyonunun potansiyel bir efektörü olarak SCV hücrelerine özgüdür. Bu özellikleri SCV hücrelerinin; fiziksel, kimyasal ve çevresel olumsuz koşullara dayanıklılığını açıklamaktadır. SCV formu; DNA'sının *Hq1* ile yoğunlaştırılmış oluşu, dipikolinik asit ve sistein açısından zengin bir spor kılıfı içermemesi gibi özellikleri ile tipik gram pozitif bakteri spor formundan farklılık göstermektedir (Minnick et al., 2012).

C.burnetii'nin vegetatif ve sporojenik gelişim siklusunda yer alan LCV ve SCV hücrelerinin fizyolojik aktivitelerinden sorumlu proteinlerin bir kısmı kütle spektrometre ile belirlenmiştir. Bunlardan; *NusA* (N utilization protein) transkripsiyonda, ribozomal proteinler *RpsA* ve *RplI* ile uzama faktörü *EF-Tu* (elongation factor) translasyonda, *FtsZ* (cell division protein) hücre bölünmesinde, *ScpB* (segregation and condensation protein) ve *ParB* (chromosome partitioning protein) kromozom bölünmesinde, *RibH* riboflavin biyosentezinde, *GroEL* (chaperone) ve *HtpG* (chaperone protein) protein katlanmasında yer alarak, LCV hücrelerinin vegetatif aktivitelerinde rol oynarlar. Porin aktivitesine sahip *P1* proteini besin alımından sorumludur ve LCV hücrelerinin büyüme fazında aktiftir. *Tol B* proteinleri, *GTP* (G proteini) bağlayan protein *Era* ve sistatyonin beta-liyazise SCV hücrelerine membran stabilitesi sağlayarak, hücrenin çevresel direncine katkıda bulurlar. Alternatif sigma faktörü *RpoS*'in durağan fazda hayatta kalmak için gereken gen regülasyonunu sağladığı düşünülmektedir (Coleman et al., 2004; 2007).

2.3.2 Genomik özellikler ve tiplendirme çalışmaları

C.burnetii, 2 Mbp'lik küçük bir kromozoma sahiptir. Bütün suşları 30-51 kbp arasında değişen büyüklükte ve genetik bilginin %2'sini oluşturan, bir

otonom plazmit içerir. 16S rRNA sekanslama çalışmaları, farklı coğrafi bölgelerden ve çeşitli konakçılardan elde edilen *C.burnetii* suşları arasında, genetik homojeniteye işaret etmektedir. Ancak klinik semptomların çeşitliliği, izole edilen suşların patojenitesindeki farkları göstermektedir. Belirli suşların heterojenitesi ve akut ya da kronik enfeksiyonla bağlantısı genotiplendirme yöntemleri ile ortaya konmuştur. Genotiplendirme; Q ateşi gibi zoonoz bir enfeksiyonda, insan enfeksiyonlarının hayvan kaynağını bulmada büyük öneme sahiptir (Beare et al., 2006, 2009).

İlk çalışmalar; 16S/23S rRNA, *com1*, *mucZ*, *icd* gibi tek genom hedeflerinin sekans çalışmalarına, plazmit tiplerine ve kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizm (RFLP-SDS- PAGE), darbeleri alan jel elektroforezi (RFLP-PFGE) gibi yöntemlere dayandırılmıştır. Daha sonra PCR-RFLP analizi ve mikroarray ile tüm genom dizileri elde edildiğinde karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) geliştirilmiştir. Plazmit açık okuma çerçevelerinde (ORF) ve kromozom dizilimlerinde polimorfizmlere dayanarak yeni genomotipler tanımlanmıştır. Tüm genom sekans verileri *C.burnetii* suşları arasındaki genetik çeşitliliği göstermiş ve yeni moleküler tiplendirme sistemlerinin tasarlanıp uygulanmasına öncülük etmiştir. Şu an halen kullanılan üç temel genotiplendirme metodu vardır. Bunlar çoklu lokus değişken sayı tandem tekrarı (VNTR) analizi MVLA, multispacer dizi tiplemesi (MST) ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) genotiplendirmesidir. Bu yeni yöntemler, zorlu patojenin moleküler epidemiyolojik çalışmalarını geliştirmede önemli adımlar atılmasını sağlamıştır (Massung et al., 2012).

C.burnetii genomunda; *QpH1*, *QpRS*, *QpDG*, *QpDV* ve belirlenemeyen bir tip olmak üzere 5 farklı tip plazmit saptanmıştır. Plazmidal sekanslar arasındaki yüksek homoloji, patojenin hayatta kalması için plazmitlerin gerekli olduklarını düşündürmüştür. Bu hipotez RPLF tekniği ile doğrulanmıştır. Plazmit profilleri, karakterize edilmiş 6 farklı *C.burnetii* genomik grubu ile korelasyon göstermiştir. Bu tespit plazmitlerin; *C.burnetii* suşlarının farklı virülans seviyelerini belirleyen spesifik virülans faktörlerini kodladığını göstermektedir. 39 kbp büyüklüğündeki plazmit *QpH1*, Nine Mile RSA 493 suşundan izole edilmiştir. Akut enfeksiyonla ilişkili olan genomik grup 1, 2 ve 3 suşlarını temsil eder. 30 kbp büyüklüğündeki plazmit *QpRS*; atık yapmış bir keçi ve endokarditli bir insandan elde edilmiş Priscilla Q177 suşundan izole edilmiştir. Kronik enfeksiyonlarla bağlantılı

genomik grup 4'deki suşlarda bulunmaktadır. 30 kbp büyüklüğündeki plazmit *QpDV*, genomik grupların hiç biri ile karşılaştırılmamıştır. 51 kbp büyüklüğündeki plazmit *QpDG* ise rodentlerden izole edilmiş olup, genomik grup 6'da bulunan Dugway 5J108-111 suşundan elde edilmiştir. Bu suş insanlarda patojen değildir. Genomik grup 5 kromozomla entegre olmuş plazmit benzeri sekansları içeren suşlara aittir. Corazon suşu kromozomal DNA'da *QpRS* sekansları ile benzer homologiler içerir (Hendrix et al., 1991; Willems, et al., 1993; Jäger et al., 1998) .

C.burnetii Nine Mile phase I RSA 493 suşu, ilk kez 2003 yılında mikroarray teknolojisi ile sekanslanmıştır. Bu çalışmalar RFLP gruplu suşların ilişkisini doğrulamış ve plazmit *QpDV*'nin dahil edildiği, genomik grup 7 ve 8 olmak üzere iki yeni grup tanımlamıştır. Tüm genom sekanslama, bakterinin çalışıldığı birçok alanda ilerleme sağlamıştır. Genom analizi ile; invazyon, istila, hücre içi trafik, konak hücre modülasyonu ve detoksifikasyonda potansiyel rolleri olan birçok gen ortaya çıkarılmıştır. *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Mycobacterium* gibi zorunlu hücre içi bakteriler; azaltılmış metabolik faaliyetler ve mobil elemanların eksikliği gibi özellikleri paylaşır. *C.burnetii*; hücre içi yaşam stratejisinde bu türlerle benzerlik göstermesine rağmen; genom redüksiyonu, mobil elemanların varlığı, genom mimarisi, metabolik yetenekler ve taşıyıcı profilleri açısından büyük ölçüde farklılıklar gösterir. *C.burnetii* genom analizi; genom redüksiyon sürecini gösteren sayısız mobil element ve psödogenlerin varlığını ortaya koymuştur. Genom redüksiyonu intrasellüler bakterilerde yaygındır. Bir zamanlar önemli işlevi olan genler mutasyonlar biriktirir ve sonunda yok olurlar. Genomda; nokta mutasyonlarına sahip 83 psödogenin varlığı, *C.burnetii*'nin diğer intrasellüler bakterilere oranla genom redüksiyonu evriminin başında olduğunu göstermektedir (Seshadri et al., 2003; Beare et al., 2006, 2009). Aynı zamanda *C.burnetii* genomunda kromozom etrafına yayılmış 29 insersiyon sekansı (IS) elementi ve 3 dejenere transpozon belirlenmiştir. *IS1111* isotipi genomda 56 kopyaya kadar görülür ve 7 bp'lik sekans kalıplar halinde tekrar eden, 1400 bp'lik insersiyon sekansı içerir. Bu element hassas tanısal PCR'da spesifik bölge olarak kullanılır. 2007 yılında Denison ve ark.; *IS1111* elementlerinin içini her element için spesifik olarak bir upstream primer ile kombinasyon halinde bir antisens primer kullanarak, PCR ile analiz edilen bir genotiplendirme yöntemi geliştirmiştir.

Genomda; seçilmiş bölge 16S/23S rRNA'da, ORF'lerin arasında hayli değişken 10 intergenik bölgenin analizine dayanan MST yöntemi, dünyanın çeşitli bölgelerinden gelen 173 *C.burnetii* suşu için kullanılmıştır. Bu anlamda en kapsamlı çalışmadır. Bu yöntemle 30 genotipik ve 3 monofilogenetik grup saptanmıştır. Bu gruplar plazmit tipleri ile korele edilmiştir. Yöntem ayırt edicidir ve dünyada sık kullanılmaktadır. MST genotiplemesi *C.burnetii*'nin bir bölgeden diğerine, hayvan rezervuarlarından insanlara yayılımını izlemeye yardımcı olur. Örneğin MST20 Amerika'da insan ve ruminantlarda, Avrupa'da ruminantlarda tanımlanmış olup, hastalığın tarihsel süreçte yeni dünyaya yayılımını yansıtmıştır. Buna karşılık MST17 bugüne dek yalnızca Fransız Guyanası'nda elde edilmiş ve hastalığın ciddi formlarına neden olmuştur. Hollanda'da da MST genotiplemesi MST33'ü tanımlamış ve hastalık kaynağının keçi sürüleri olduğunu doğrulamıştır. Filogenetik analiz, MST33'ün Almanya'dan Hollanda'ya Fransa üzerinden yayıldığını ortaya koymuştur. MST genotiplendirmesi dünyadaki suşların filogenetik bağlantısını ortaya koyma özelliği nedeni ile 'coğrafi yöntem' olarak nitelendirilmiştir (Glazunova et al., 2005).

DNA'da yüksek oranda korunmuş, ardışık tekrarlanan dizilerin sayısındaki değişimin, tandem tekrarı yazılımı gibi bir yazılımla sorgulanmasına dayanan VNTR-MVLA genotiplendirmesi; *C.burnetii* için birbirinden bağımsız iki ayrı çalışma halinde planlanmıştır. Svraga vd. (2006), 21 izolattan 5 ana grup ve 9 MVLA tipi belirlemişlerdir. Arricau-Bouvery vd. (2006) ise daha güçlü bir ayırt edicilik sağlamak için iki ayrı marker paneli kullanarak, 42 izolat analiz edip 36 MVLA tipi ortaya koymuştur. Yöntem Avrupa'da özellikle ruminantlar suşları genotiplendirmede çok kullanılmıştır. Yöntemin ayırım gücü MST'den yüksek olmakla beraber, stabil olmayan DNA tekrarlarına dayanmaktadır ve fazla ayırmacı sonuçlar üretilebilmektedir. Laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılmasında güçlükler yaşanmaktadır ve tekrarlanabilirlikten yoksundur.

SNP genotiplemesi; bir kültür basamağına gerek olmadan doğrudan insan ve hayvan örneklerine uygulanabilir bir yöntem olarak Hollanda salgınında geliştirilmiştir. Genbankta mevcut 5 *C.burnetii* tam dizisi kullanılarak 10 ayırt edici SNP seçilmiş ve SNP'lerin ters transkripsiyon-PCR (RT-PCR) ile tespiti yapılmıştır. 14 insan ve 26 hayvan örneğinde gerçekleştirilmiş ve 5 farklı genotip ortaya koyulmasına imkan vermiştir. Yöntem Belçika ve Amerika'da da çiftlik

hayvanları ve kene türleri için kullanılmıştır. Daha sonra MST lokasyonlarından SNP imzalarının çıkarıldığı, MST genotiplendirilmesinden türetilen bir SNP bazlı yöntem ortaya koyulmuştur. SNP genotiplendirilmesi metodu, daha önce türetilmemiş izolatların genotiplendirilmesini sağlayarak coğrafi tiplerin dünya çapında karşılaştırılmasına imkan veren bir veri tabanını geliştirmiştir (Hornstra et al., 2011).

2.3.3 Asit ortama adaptasyon ve metabolizma

Orta derecede asidofil bir bakteri olan *C.burnetii*; ökaryot hücrelerin fagositlerinde bulunan fagolizozomların asit ortamında yaşamını sürdürebilme ve replike olabilme yeteneğine sahiptir. Asit ortamda besin ve substrat taşınması da artmaktadır. *C.burnetii* genomu; asiditenin tamponlanması ve dolayısıyla aktif taşınmanın sağlanmasında görev alan çok sayıda önemli proteini kodlar. Ayrıca pH'yı dengede tutan sodyum iyon/proton değiştiricisi, duyarlı iyon kanalı ve taşıyıcısı ve osmoprotektanlar ile osmotik strese ve konakçı antimikrobiyal defanslerine karşı direnç sağlamaktadır (Mertens et al., 2012).

C.burnetii muhtemel karbon kaynakları olarak, iki adet ksiloz ve glikoz şeker taşıma, 15 adet aminoasit ve iki adet peptid taşıma sistemine sahiptir. Diğer zorunlu intrasellüler bakterilere kıyasla biyosentetik kabiliyeti yüksektir. Trikarboksilik asit döngüsü, glikoliz ve pentoz-fosfat metabolizmasının bazı enzimlerine sahiptir. *Chlamydia* ve *Rickettsia* türlerinden farklı olarak *C.burnetii* bir enerji paraziti gibi davranmaz, ATP'yi konak hücreden sağlayamaz. *C.burnetii* tarafından glutamatin ve glukozun alımı asit şartlarda uyarılmakta ve oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP yoğunluğunu artırmaktadır. Bu nedenle *C.burnetii* oksijen taşınımının fazla olduğu dokulara ilgi göstermektedir (Seshadri et al., 2003).

C.burnetii fagozom içerisindeki oksidatif strese; fagolizozom füzyonunu geciktirmek, hücresel NADPH oksidazı inhibe etmek, düşük demir ortamları tercih ederek genom stabilitesini korumak, DNA onarım genlerini devreye sokmak, vakuol ortamını enzimlerle detoksifiye etmek gibi yollar ile karşı koyar. Bu önlemler vakuollerdeki replikasyonun düzenlenmesi için önemlidir. Bakterinin geliştirdiği stratejiler tam aydınlatılamamakla birlikte bilgiler genom sekans

çalışmalarına dayanmaktadır (Miller, 2012). *C.burnetii*; konakçı hücrenin birincil savunma mekanizması olan; süperoksit (O_2), nitrit oksit (NO), hücrel NADPH oksidaz (phox) ve indüklenabilir nitrit oksit sentaz (iNOS) gibi yıkımlayıcı mediatörleri detoksifiye etmek adına çeşitli enzim sistemlerine sahiptir. Asit fosfataz ile oksidatif yıkımın baskılanması, süperoksit dismutazların (*Sod*), katalaz ve peroksiredoksin salınımı ile serbest radikallerin enzimatik olarak yıkımlanması bu kapsamdadır. *C.burnetii* *SodA* ve *SodC* olmak üzere iki çeşit süperoksit dismutaz enzimi kodlar. Bu enzimler süperanyonların detoksifiye edilmesini sağlar. Ortamdaki hidrojen peroksitlerin, oksijen ve suya ayrılması ise katalaz enzimi vasıtası ile olmaktadır (Mertens et al.,2012).

C.burnetii; oksidatif stres karşısında, DNA'ya zarar verici etkilerle baş etmek için *OxyR* ve *RpoS* genleri tarafından düzenlenen değişik DNA tamir mekanizmalarını kullanır. Baz eksizyon onarımında (BER); *tagA* ve *mpg* genleri tarafından düzenlenen metil uyumsuzluğu tamir sistemi (MMR) ile metil grupları uzaklaştırılarak DNA yapısı enzimatik yolla eski haline getirilir. *UvrABC* genleri kontrolündeki nükleotid eksizyon onarımı (NER) ise BER sistemine göre daha geniş bir hasarlı alanı görür, hasarlı DNA'nın DNA helikaz ile birlikte uzaklaştırılmasına dayanır. Rekombinasyonel DNA tamiri ise, DNA hasarının neden olduğu tek iplikli (ssDNA) bölgelerini tanıyan *RecA* ile düzenlenir (Wang et al., 2005; Friedberg et al., 2006; Park et al., 2010).

2.3.4 Faz varyasyonu

C.burnetii'nin dış zarının ana molekülü olan lipopolisakkarit tabakası (LPS); ortaya koyduğu moleküler değişiklikler ile immün sistemden kaçışa hizmet eden önemli bir virülans faktörüdür. Enterobakterilerde görüldüğü gibi *C.burnetii* de antijenik varyasyon gösterir. Faz değişimi, farklı genomik gruplarda bulunan *C.burnetii*'ler arasında benzer şekilde meydana gelir. Virülan form olarak tanımlanan faz 1; doğal kaynaklardan elde edilir ve tam uzunlukta bir LPS ile karakterizedir. *C.burnetii*'nin embriyolu tavuk yumurtası ve doku kültüründe birkaç seri pasajından sonra molekül ağırlığında geri dönüşümsüz değişiklikler oluşur, yüzey antijenlerini kaybeder ve avirülan faz 2'ye dönüşür (Honstetter et al., 2004).

Faz geçişi, LPS biyosentezinde görev alan genlerin mutasyonu ile ilişkilidir. Lipid A biyosentezinde  adımı katalize eden; *LpxA*, *LpxD*, *LpxC* ile i çekirdek ve O-antijen sentezinde yer alan *GmhB*, *WecA* bunlar arasındadır. Bu genler tüm *C.burnetii* suşlarında korunur ve in vivo inhibe edilmeleri; immün sistem tarafından etkin bir şekilde temizlenen faz 2'ye dönüşüme sebep olur. Faz 1; L-virenoz ve dihidrohidroksistreptoz ve galaktozamin uronil gibi şekerler içeren bir O antijenine sahipken, avirlent faz 2 O antijeni barındırmamaktadır. Avirlan ve virülan formların Lipit A molekülleri ktle spektrometresinde özdeş bir kimyasal yapı sergilemektedir (Beare et al., 2008).

Fagositoz etkinliği; CR3'n (Complement receptor-3), $\alpha\beta3$ integrin ve CD47 (Cluster of Differentiation 47) ile aktivasyonuna bağlıdır. Faz 1 *C.burnetii* LPS'si aracılığıyla, CR3 dahil integrinler arası etkileşimi inhibe ederek, aktin hücre iskeleti organizasyonunu yeniden yapılandırarak fagositosizi önler. Faz 1 patojeni, bakterilerin CR3'e bağlanmasını kısıtlayan, tam bir LPS yapısına sahiptir. Konak hücreye girişte faz 1, THP-I (Human leukemia monocytic cell) lökositleri üzerindeki alfa ve beta integrin reseptörü ile etkileşime girerken, faz 2 bunlara ek olarak ayrıca CR3 ile etkileşime girer (Schaik et al., 2013). Faz 1'in pürüzsüz LPS'nin yapısı, LPS içindeki ligandları tanıyan, TLR2 (Toll Like Receptor) reseptörleri tarafından bakteriyel tanımlamayı maskeler. Buna karşılık, avirülan faz 2 *C. burnetii*, terminal O antijen şekerlerini içermeyen ve kolayca TLR2 tarafından tespit edilen kaba bir LPS üretir; bu tespit interlökin 12 (IL-12) ve tümör nekroz faktörü (TNF) retimini indükler ve bakterilerin temizlenmesine aracılık etmek için makrofajları aktive eder. Tersine, faz I *C. burnetii*, birincil dendritik hücrelerin (DC'ler) olgunlaşmasını indklemez ve nispeten düşük seviyelerde IL-12 ve TNF üretimine neden olur (Abnave et al., 2017).

2.4 Patogenez ve Patoloji

İntrasellüler patojenitenin temeli; bakterinin, konak aracılı yıkımlayıcı etkiye karşı koyması ve replikasyonunu sürdüreceği bir ortam oluşturmasına dayanmaktadır. Fagositik hücreler içerisine alınan bakteri, endositik yolla vakuollere ya da fagozomlara dahil olduktan sonra çoğunlukla fagolizozom ortamı bakteriyi yıkımlayacak şekilde asitleşir. Çoğu parazitik bakteri bu yıkımlayıcı etkiden kaçacak stratejiler geliştirmiştir. Tersine *C.burnetii*

fagolizozomal vakuollerin asit ortamındaki yaşama adapte olmuştur ve terminal fagolizozomlara benzemeyen bu özel asidik yuvaların biyolojik oluşumunu yönlendirerek farklı bir yol izler. *C.burnetii*; intrasellüler yaşam döngüsünde, fagolizozomal vakuoller içerisinde bölünüp çoğalabilen bilinen tek patojen bakteridir. Bu karakteristik özellik *C.burnetii* enfeksiyonunun patomekanizmasının en önemli unsurunu oluşturur (Larson et al., 2016; Voth et al., 2007).

2.4.1 Hücreye giriş

C.burnetii'nin neden olduğu enfeksiyon, bulaşıcı aerosollerin solunmasından kaynaklanır. *C.burnetii* SCV hücrelerinin konak hücrelerinin monosit ve makrofajlarının içine alınması, mikroflamentlere bağlı endositoz yoluyla gerçekleşir. *C.burnetii*'nin hücreye girişinde bakteri LPS'si, konakçı spesifik bağlanma reseptörleri integrinler ve CR3 arasında etkileşimler söz konusudur (Dellacasagrande et al., 2000).

Virülen faz I'in insan monosit benzeri THP-1 hücrelerine yapışması, konakçı hücre zarının bakteri adezyon bölgesine doğru çıkıntılanmasına neden olur. Faz 1 bakteri THP-1 lökosit reseptörü $\alpha\beta3$ integrin ve toll-like reseptör 4 (TLR4) komplekslerini kullanarak monositlere bağlanırken, faz 2 *C.burnetii* $\alpha\beta3$ integrin ve makrofajların CR3 reseptörü ($\alpha\beta2$ integrin) ile bağlanır. *C.burnetii*, apoptotik hücrelerin fagositoz yolu ile uzaklaştırmasından sorumlu $\alpha\beta3$ integrinle bağlanarak inflamasyonun uyarılmasını engeller. Hücre iskeletinde mikrofilamentlerin reorganizasyonu sadece Faz 1 patojende görülür. Diğer invaziv bakterilerde görüldüğü gibi, hücre iskeletindeki değişiklikler konakçı GTPaz'ları (Guanosine triphosphatase) aktive etmek yoluyla fagositosuzu başlatmaktadır (Roman et al., 1986; Baca et al., 1993; Capo et al., 2019).

2.4.2 Hücre içinde parazitik vakuol gelişimi

Endositik fagozomlar ile hücre içine alındıktan sonra, ilk 6 saatte, *C. burnetii*'nin konakçının otofagosomları ve endozomları ile etkileşimleri söz konusudur. Bu etkileşimler, otofajik marker LC3'ün (mikrotubule bağlı protein-Hafif Zincir 3) ve endozomal GTPaz Rab5 varlığında gerçekleşir. *C.burnetii*'nin

fagositozu GTPaz varlığında erken fagozom oluşumu ile sonuçlanır (Roest et al., 2013).

Faz 1 *C.burnetii* içeren erken fagozomlar fagositozdan başarı ile kaçtıktan sonra olgunlaşma sürecine girer. GTPaz fagozomların füzyonunu uyarır ve erken endozomal markerların alımı ile lümende asidifikasyon başlar. Fagozomlarda; lümene sürekli proton pompalayan GTPaz Rab7, LAMB1 ve LAMB2 ve ATPaz varlığı ile pH 5'e kadar düşürülür ve nihayetinde fagozomlar lizozomal kompartmanlar ile kaynaşır. Bir araya gelen fagolizozomlar; bakterinin benzersiz biyokimyasal stratejileri ile yönettiği hücrel süreçlerin görüldüğü asidik kompartmanlar olan vakuollere dönüşür. PV (paraziter vakuol) oluşumunun bu aşamasında, boşluklar orta derecede asidik bir ortamla (pH = 4,5) karakterize edilir. Vakuol lümeni; asidik fosfataz, 5'nükleotidaz ve katepsin D gibi asidik hidrolazlar; LC3, Rab7 ve Rab24 yüzey işaretleyicileri; H⁺ + ATPase; lizozomal glikoproteinler LAMB 1, 2, 3; flotillin 1, 2 gibi lizozomal membranla bağlanmış ilave protein işaretleyicilerine sahiptir (Schaik et al., 2013).

Ek olarak, PV membranı, önemli bir yapısal rol oynayan ve *C.burnetii* enfeksiyonu sırasında sinyal iletimini sağlayan kolesterol ile zenginleştirilir. Kolesterolün yapısal fonksiyonu çift lipid tabakasının mekanik direncini artırmaktır. Böylece bakteri içeren olgun PV, vakuolleri büyük olmasına rağmen mekanik hasarlara karşı oldukça dirençli hale gelir. Kolesterol aynı zamanda, iyonların membran geçirgenliğini de azaltır ve bu da protonların kaçışını en aza indirdiği için PV'nin asidik pH'sının sürdürülmesinde yardımcı olur. Kolesterol lipoproteinlerle birlikte; flotillin-1 ve 2, sinyal iletimi ve membran füzyonu gibi birçok hücrel fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynar. PV, endozomların sıvı fazıyla sürekli bağlanır, bu nedenle endozomal sıvı faz belirteçleri, vakuollerin lümeninde sürekli bulunur. *C.burnetii* SCV hücreleri, LCV'ye doğru morfolojik dönüşüme uğrar ve replikasyon başlar (Gilk, 2012).

Normal koşullarda; hücre tarafından sitoplazmik materyali bozmak ve hasarlı organelleri otofagolizozomlara taşınmaları sırasında uzaklaştırmak için kullanılan bir işlem olan otofaji mekanizması, *C.burnetii* tarafından yaşam döngüsü boyunca gerekli olan besin bileşiği kaynağı olarak PV oluşumunun ilk basamağı olarak uyarlanmıştır. Endolizozomal vakuoller içeren otofagosomlarla

yapılan çoklu füzyon, vakuolar membranda PV'lerin büyümesi için ihtiyaç duyulan boşluğu sağlamada temel bir rol oynar (Castrejón et al., 2015).

İçerisinde *C.burnetii* 'nin bulunduğu olgunlaşmış vakuoller; (CCV–Coxiella containing vacuol) bakterinin intrasellüler replikasyonunu ve ekstrasellüler stabilitesini korumak için, konakçı zar nakil yollarını değiştirmek gibi mekanizmalar ile farklılaştırdığı lizozom benzeri organeller olarak düşünülmektedir. SCV'nin LCV'ye dönüşümü; bu vakuollerde gerçekleşir. 16 saat sonunda CCV sadece LCV hücrelerinden oluşmaktadır. CCV'lerin sağladığı asidik ortam bakterinin metabolizmasını ve enfeksiyon sürecini yönetecek proteinlerin üretimini aktive etmektedir (Beare et al., 2011; Kohler et al., 2015).

C.burnetii; CCV'nin içinde çoğalmak için, arasında filogenetik olarak yakın ilişkisi bulunan *Legionella*'nın Dot/Icm Tip IV B Salgılama Sistemi (T4BSS)'ne homolog bir formda olan efektör proteinlerin varlığına ihtiyaç duyar. T4BSS, hücre içi yaşam döngüsü içerisinde temel virülans faktörü olarak görev alır (Newton et al., 2013). T4BSS; *C.burnetii* SCV hücrelerinin CCV'lere dahil olması ile aktive olur ve membranı boyunca ve konakçı hücreye 130'dan fazla bakteri efektör proteinini transloke eder. Bu proteinler; patojen enzimatik aktivitesinin; otofaji, immun cevap, apoptosiz gibi konakçı proseslerinin düzenlenmesi ile patojen-konakçı etkileşimleri yoluyla vesiküler protein trafiğinden sorumludur (Wallqvist et al., 2017).

Bakteriyel sekresyon faktörlerinin ortak özelliği, konak hücrelerin proteinlerinin aktivitesini fonksiyonel olarak taklit eden ökaryotlara benzer hareketlerin varlığıdır. *Icm* genlerde fonksiyon kaybı mutasyonları içeren *C. burnetii* suşları konakçı hücrelerin içinde çoğalamaz. Transpozon insersion sekanslama teknolojisi (Tn INSeq) ile mutant efektör proteinlerinin izlendiği bir çalışmada; bu mutantları içeren *C.burnetii* suşlarının hücre kültürlerinde küçük CCV oluşturduğu ve düşük replikatif oranlar gösterdiği ortaya konmuştur (Crabill et al., 2018).

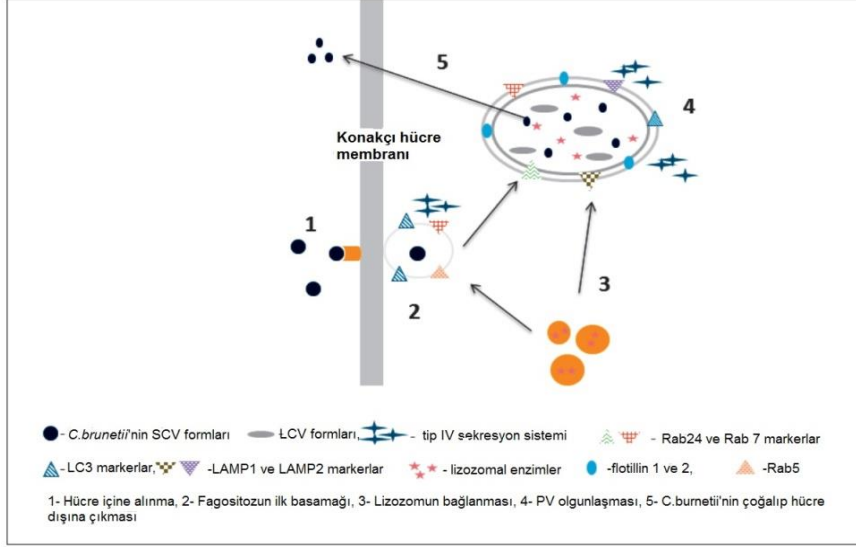
2.4.3 Olgunlaşmış parazitik vakuol

Enfeksiyondan yaklaşık 6 gün sonra; durağan faz başlar, CCV ağır bir şekilde LCV hücreleri ile yüklenir ve bunlar tekrar SCV hücrelerine dönüşmeye

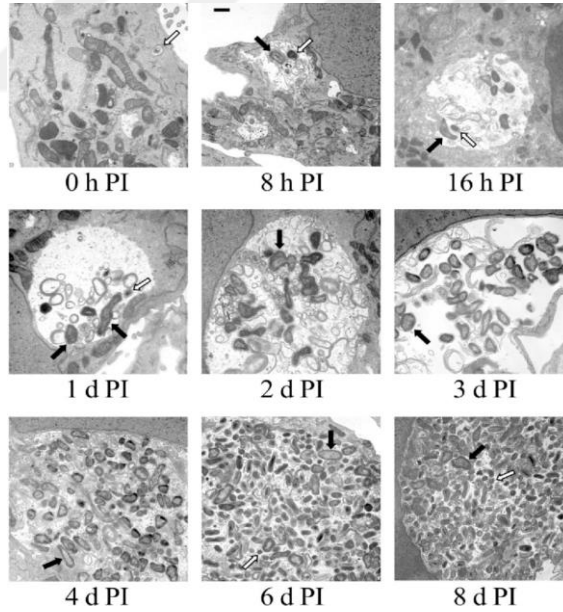
başlar. Şaşırtıcı bir biçimde konakçı hücrenin tüm sitoplazmasını kaplayabilen CCV'ler, aynı zamanda konak hücrenin yaşamını devam ettirmesini de mümkün kılmaktadır. Konakçı savunma mekanizmalarından başarıyla kaçtıktan sonra, *C.burnetii* bakterileri hayatta kalabilmek ve hücrelerin içinde çoğalabilmek için apoptozu inhibe edebilir. *C.burnetii* enfeksiyonu, çok sayıda apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu etkiler. A1/Bfl-1 (Bcl-2 familyası antiapoptotik proteinlerin üyesi), c-IAP2 (apoptozis protein ailesinin inhibitörleri - IAP) ve Akt ve Erk 1/2 (hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar 1 ve 2) gibi antiapoptotik proteinlerin sentezinin artmasına neden olur (Chmielewski et al., 2011). Ayrıca patojen, sitokrom c'nin mitokondriden doğrudan ya da dolaylı olarak salınmasını önleyen proteinler üreterek enfeksiyon sırasında hücre içerisindeki apoptotik ölüm yollarını etkiler. *C.burnetii*, konakçı hücrelerde apoptoz işlemini en az 4 hafta boyunca inhibe edebilir. Enfekte hücrelerin hayatta kalmasını teşvik etmek kronik *C.burnetii* enfeksiyonlarının oluşturulması ve sürdürülmesi için gereklidir (Voth et al., 2007; 2009). Hücre sitokinezi sırasında, büyük CCV'nin diğer hücrelerin enfekte olmasını önleyecek şekilde yalnızca bir hücreye ayrıldığı görülmektedir. Bu durum bakteriye enfekte olması için yeni hücreler vererek, sürekli çoğalmasına izin verirken konakçı hücreyi de koruyarak ve persiste enfeksiyonu desteklemektedir (Schaik et al., 2013; Pechstein et al., 2018).

SCV hücrelerinin, metabolik olarak aktif LCV hücrelerine dönüşümü iyi tanımlanmıştır. Ancak vakuol lümeninin LCV hücreleri ile dolmasının ardından; uzun zaman ekstrasellüler ortamda hayatta kalma ve aerosol yolla bakterinin yeni konakçılara transferinden sorumlu SCV'ye dönüş kinetiği net değildir. Olasılıkla; aşırı derecede enfekte olmuş hücreler ve dejenere olmuş endositik ve otofajik yolun besin yüklü vezikülleri vakuolde besin madde trafiğini durdurmakta; aminoasitler gibi hayati besin kaynaklarının tükenmesi ile sporulasyon benzeri süreç başlatılmaktadır (Coleman et al., 2004).

C.burnetii'nin enfeksiyon şeması Şekil 2.1'de, enfeksiyonun farklı aşamalarında LCV ve SCV hücre formları ise Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 *C. burnetii*'nin enfeksiyon şeması (Bielawska et al., 2013).



Şekil 2.2 Vero hücrelerinde; enfeksiyonun 8., 16. saati ve 1., 2., 3., 4., 6., 8. günlerinde, *C. burnetii*'nin PV içerisindeki morfolojik gelişim formlarının elektromikroskopik görüntüsü. LCV formları siyah, SCV formları beyaz ok ile gösterilmiştir (Coleman et al., 2004).

2.4.4 Patolojik bulgular

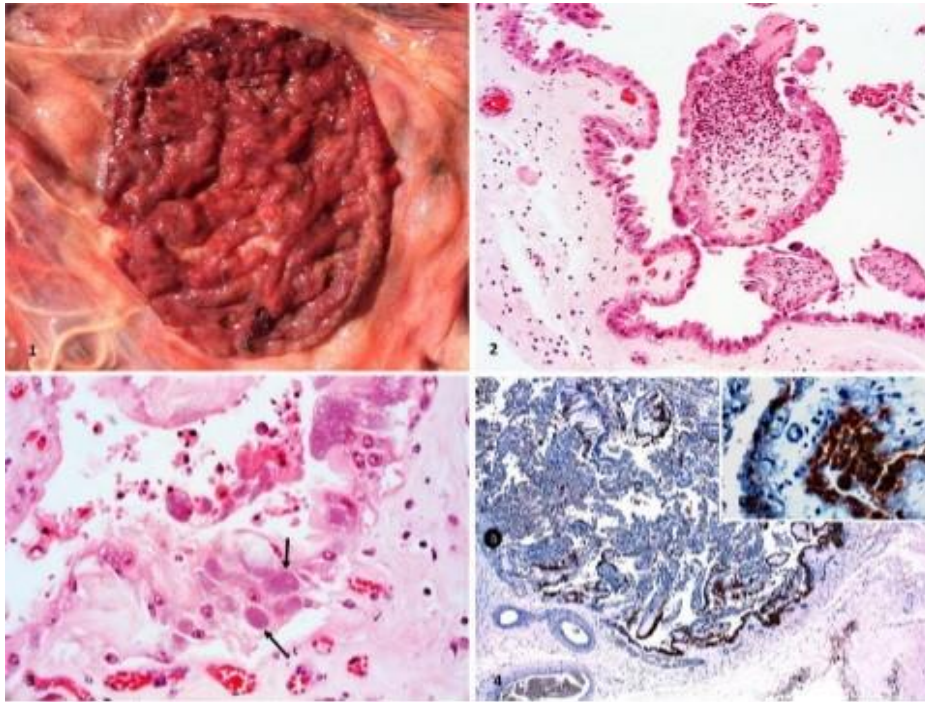
Çalışmalar, *C.burnetii*'nin başlangıçta plasentayı enfekte ettiğini ve daha sonra fetüse yayılmasının hematojen veya amniyotik-oral yolla meydana gelebileceğini göstermektedir. *C.burnetii* ile enfekte olan hayvanlar genellikle semptomatik enfeksiyon yaşamazlar. Akut fazda, *C.burnetii*'nin varlığı kanda, akciğerlerde, dalakta ve karaciğerde gösterilebilir. Ancak çoğu hayvan, ateşin olmaması da dahil olmak üzere, tamamen asemptomatiktir. Uterus ve meme bezleri, *C.burnetii* enfeksiyonunda primer bölgelerdir. Böylece bakterinin saçılımı doğum periyodu boyunca ve sonrasında devam eder. Doğum ürünleri, özellikle plaseenta yüksek miktarda *C.burnetii* ile kontamine edilir. Hayvanlarda kronik *C.burnetii* ile ilişkilendirilen tek patolojik bulgu; özellikle koyun ve keçide daha sık olmak üzere abort, sığırlarda daha sık düşük doğum ağırlığı ve infertilitedir (Agerholm, 2013).

Q ateşi enfeksiyonu hayvanlarda sıklıkla kronik hale gelir.Yapılan çalışmalar; özellikle sığırların gebelik sırasında plaseenta ve fetüsa hiçbir bulaşma olmadan enfekte kalabildiğini göstermektedir. Bu durum maternal antikor tepkisine neden olur ve gebelik yaşı arttıkça seropozitif ineklerin belirgin artan prevalansını açıklar. Q ateşi ineklerde sıklıkla kronikleşir ve sağlıklı görünen seropozitif inekler bakterinin saçılmasında etkin rol oynarlar. Ek olarak süt sığırlarında; *C.burnetii* mastit vakalarından da izole edilmiştir (Paiba et al., 1999).

C.burnetii'nin çiftlik hayvanlarındaki abortlar ile bağlantısı, doğum ve sonrası dönemde bu hayvanlarda birtakım reproduktif hastalıklara sebep olduğu varsayımını ortaya koymaktadır. Gebe uterusun enfeksiyonu suş virülansına, plasental lezyonun ciddiliğine, maternal ve fetal immun yanıtı, gebelik yaşına, fetüsta yayılmaya bağlı olarak; abort, prematüre doğum, ölü doğum, zayıf yavru doğumu, klinik olarak normal veya konjenital enfekte yavru doğumu ile sonuçlanabilir. Anne açısından; infertiliteye sebep olabilecek metrit, endometrit, yavru zarlarının atılamaması gibi sonuçlar da yaşanabilmektedir (Agerholm, 2013).

C.burnetii ile ilişkili abortlarda fetüs bazen otolize olmasına rağmen çoğunlukla tazedir ve genellikle normal görünümündedir. Makroskobik lezyonlar,

hafif hemorajik plasentitten nekrotizan plasentite değişir. Plasentit; çoğunlukla kalınlaşmış interkotiledon bۆlgeleri kapsayan sarı-kahverengimsi bir eksudatın varlığı ile birlikte dir. Koryonik epitel hۆcreleri bazofilik granۆlasyon gۆsterebilir. Bazı fetۆslerin karaciğerlerinde granۆlomatoz hepatit gۆrۆlebilir. Mikroskopik lezyonlar ise nekrotik trofoblast hۆcrelerinin dağınık odakları ve mononۆkleer hۆcrelerin mevcut olduğu hafif inflamasyondan; vaskulit, ۆdem, nekroz ve nۆtrofil infiltrasyonunun baskın olduğu şiddetli geniş inflamasyona kadar değişir (Muskens et al., 2012; Van den Brom et al., 2015).



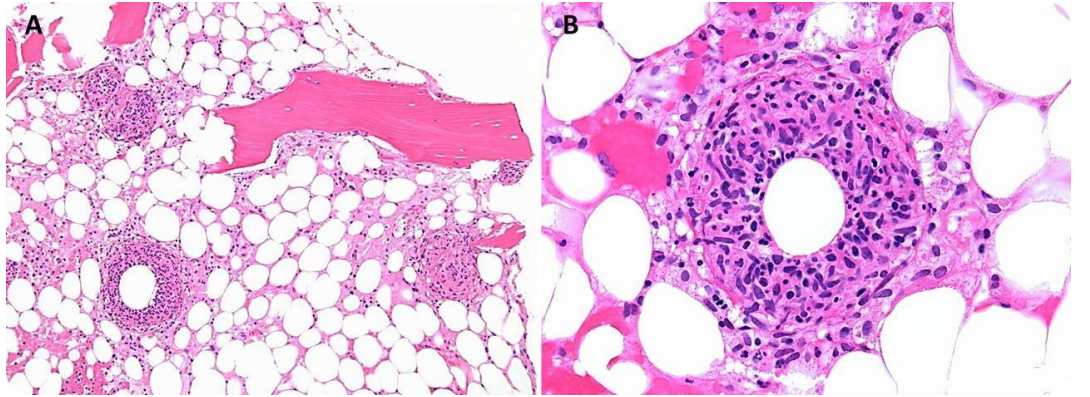
şekil 2.3 *C.burnetii* ile enfekte olmuş plasenta 1.Yaygın kızarıklık ve interkotilodoner alanlarda yarı saydamlık kaybı 2. Kotiledonlardaki koryonik villuslarda bol miktarda nۆtrofil infiltrasyonu ile nekroz 3. Trofoblastların sitoplazmasında genişlemeye sebep olmuş bazofilik bakteri kۆmelleri 4. şiddetli granular intrasitoplazmik immunoreaktivite, hematoksilin boyama ile immunohistokimya (Rioseco et al., 2019).

İnsanlarda, Q ateşinin patolojik lezyonları organ biyopsileri ile ve tanı amaçlı otopsi çalışmaları ile tanımlanmıştır. Hepatit hastalarında biyopsi ۆrnekleri sıklıkla alınmıştır, ancak Q ateşi nadiren ۆlۆmcۆl olduğu için hastalığın otopsi ile patolojik tanınması azdır. Serolojik yۆntemler ile hastalığın kesin tanısı artık yapılabildiğinden organ biyopsileri tanı için kullanılmamaktadır. Q ateşi pnۆmoniili hastalarda tipik pulmoner histopatolojik lezyonlar; bۆyۆk bir konsolidasyona, intersititsiyel pnۆmoniye, fibrin ve eritrosit içeren alveolar

eksudata dayanır. İntersititsiyel infiltrasyonlar çoğunlukla lenfosit, makrofaj ve az miktarda polimorfonükleer lökositlerden oluşur. Bu patolojik bulgular Q ateşine spesifik değildir (Whittick, 1950).

Granulomatoz hepatit; ‘Doughnut granülomu’ adı verilen oluşumların hakim olduğu Q ateşinde sıklıkla görülen bir patolojik tablodur. Karaciğer kesitlerinin histolojik incelemesinde de fokal hepatosellüler nekroz ile makrofajlar, lenfositler ve polimorfonükleer lökositlerden oluşan hücre infiltrasyonları görülür. Granülom yapılarının içinde ya da çevresinde halka granülom olarak adlandırılan bir fibrin halkası bulunur. Çok çekirdekli dev hücreler fibrin halkasını çevreler. Her ne kadar bu yapı; Hodgkin hastalığı, sitomegalovirüs enfeksiyonu, tifo gibi hastalıklarda bulunabilse de, Q ateşinin bir özelliği olarak kabul edilir. Kemik iliğindeki lezyonlar karaciğer lezyonları ile benzerlik göstermektedir (Greiner, 1992).

Q ateşi endokarditi çoğunlukla aortik ve mitral kapakları tutar. Enfekte kardiyak kapaklardaki histolojik bulgular spesifik değildir. Fibrin, trombosit ve nekrotik hücresel enkazdan oluşan trombüs, kalsifikasyon ve ossifikasyon odakları ile kollajen bırakan fibroblastlardan oluşan bir görüntü sergiler (Tobin, 1982).



Şekil 2.4 Q ateşi enfeksiyonunda kemik iliğinde ‘Donut granülomları’ (Herndon and Rogers, 2013).

2.5 Q Ateşi Enfeksiyonunda Bağışıklık

C.burnetii; hayatta kalmak ve replikasyonunu sürdürmek için myeloid hücrelerin mikrobisidal aktivitesine müdahale, inflamatuvar yolların

sönümlenmesi, immun hücrelerin etkisiz hale getirilmesi gibi yolları kullanan zorunlu intrasellüler bir mikroorganizmadır. *C.burnetii*'ye immun cevap granülomlar ile organize edilir. Ancak bu yanıt nüks riskini ortadan kaldırmaz. Doğal bağışıklık enfeksiyonun kontrolü için yeterlidir, edinilmiş immun yanıt ise bakterinin temizlenmesini mümkün kılar. Kronik enfekte hastalarda ve akut enfekte hastaların bazılarında, hastalığın kontrolsüz immun yanıt gibi bazı özelliklerinde her ikisi de rol oynar. Maruz kalan hastaların çok az bir kısmının kronik Q ateşi geliştirmesi, konakçı immun tepkisi ile ilişkili genetik faktörlerin önemini ortaya koymaktadır (Amara et al., 2012).

Q ateşi bireylere aerosol yolla bulaşır ve primer enfeksiyon gelişir. Hastaların yarısından fazlası seroloji pozitif olmak dışında bir belirti göstermez ve sadece %2'sinde hastaneye yatacak kadar ciddi akut enfeksiyon gelişir. Akut Q ateşi çoğunlukla bir antibiyotik tedavisi olmadan çözülür. Bununla birlikte görünüşte iyileşmiş hastalarda enfeksiyon, aylar ya da yıllar sonra kronikleşip kalıcı hale gelebilir. Kalp kapağı hasarlı olan hastalar, kanserli hastalar, gebe kadınlar kronik enfeksiyon riski altındadır. Kronik enfeksiyonun temel klinik tablosu endokardittir. Primer Q ateşi enfeksiyonunun kontrolü, hücre aracılı immun yanıt ve interferon- γ (IFN- γ)'nın kritik rolü ile granülom oluşumunu içerir. Primer bir enfeksiyon az sayıda vakada kronikleşir. Kronik Q ateşi; defektif granülom oluşumu ve IL-10'un yüksek miktarda üretimi ile karakterizedir (Capo and Mege, 2012).

2.5.1 Doğal bağışıklık

Makrofaj ve monositler *C.burnetii*'nin ana hedefleridir. Plasental trofoblastlar ve adipozit doku da *C.burnetii* ile enfekte olmaya adaydır ancak bu dokulardaki mekanizması hala bilinmemektedir. Mikroorganizmanın fagositozu, patojen ile ilişkili moleküllerin (yüzey karbonhidratları, peptidoglikanlar veya lipoproteinler gibi) örüntü tanıma reseptörleri tarafından tanınması veya dolaylı olarak opsoninlerin (CD3 gibi) aracılık etmesi yoluyla olabilir. Fagositoz etkinliği; konak hücre yüzeyindeki $\alpha\beta3$, $\alpha M\beta2$ (CR3), CD47 gibi fagositik reseptörlerin aktivasyonuna bağlıdır (Amara et al., 2012).

Faz 1 virülan *C.burnetii*, LPS'si vasıtası ile; integrinler arası etkileşimi inhibe eder, aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesine yol açar ve protein tirozin kinaz yollarını aktive eder. Böylece reseptör aracılı fagositoz inhibe edilmiş olur. $\alpha\beta3$ integrin yoluyla bağlanma, $\alpha\beta3$ ve CR3'ün ayrışması, makrofaj inaktivasyonu ile sonuçlanır. Dolayısıyla, faz 1 bakteri düşük oranda ve zayıf bir şekilde hücre içine alınır. Hedef immun hücrelere daha az oranda LPS sunulur. Bu durum *C.burnetii*'nin hücre içinde kalıcılığı için kritik öneme sahiptir. Faz 2 avirülan bakterinin, $\alpha\beta3$ integrinin yanı sıra $\alpha M\beta 2$ (CR3) ile de bağlanması; tümör nekrosis faktör (TNF) salınımını virülan bakteriden daha çok uyarması, dolayısıyla yüksek oranda fagositozu ve ölümü ile sonuçlanır (Meconi et al., 2001).

İntegrinlerin yanı sıra Toll benzeri reseptörler (TLR) de; granülom formasyonu ve sitokin üretiminde ve hücre iskeleti yeniden düzenlenmesinde rol alarak makrofaj enfeksiyonuna katkı sağlar. TLR-2 ve TLR-4 hücre yüzeyinde yerleşmiş protein yapıda, mikrobiyal patojen kalıpları tanıyan molekülüdür. Bu reseptörlerin doğal immun sistem tarafından tanınması ile sitokinler, kemokinler uyarılır, antijen spesifik reseptörler toplanır. Ayrıca IFN'u uyartabilme potansiyelleri de vardır. Böylece TLR'ler direkt ve dolaylı olarak hem doğal hem de edinilmiş bağışıklıkta rol oynarlar (Zamboni et al., 2004). Bütün bu membran reseptörleri, sitokinler, kemokinler ve efektörler mediatörlerin monosit ve makrofajların *C.burnetii* ile etkileşimi; makrofajların fonksiyonel polarizasyonları ile sonuçlanır. Pro-inflamatauar M1 polarizasyonu bakterinin hayatta kaldığı fakat replike olamadığı dinlenme monositlerinde yürütülür. Akut Q ateşinde görüldüğü üzere, M2 programı ise bakterinin replikasyonunun kontrol edilemediği aktive edilmiş makrofajlarda başlatılır. Makrofaj aktivasyonundaki bu farklılıklar, *C.burnetii*'nin hayatta kalmasında etkilidir. M1 programı TNF, IL 6 ve IL 12 gibi sitokinleri; M2 programı ise, IL-10 ve büyüme faktörü TGF- β sitokinlerini serbest bırakır (Benoit et al., 2008a; 2008b).

Dendritik hücreler (DC) ise antijen sunucu fonksiyonları ile farklılaşmış T hücrelerini uyarak primer immun yanıtın oluşmasında önemli rol oynayan hücre tipleridir. Antijenleri yakalama, işleme ve uygun ko-stimülan moleküllemlerle T hücrelere sunma gibi özelliklere sahiptir. Faz 1 *C.burnetii* DC'lerde olgunlaşmayı

indüklemekten çoğaldığı, faz 2 bakterilerin ise tersine DC olgunlaşmasını tetiklediği düşünülmektedir (Shannon et al., 2005).

2.5.2 Edinilmiş bağışıklık

Primer Q ateşi enfeksiyonunun kontrolü sistemik hücre aracılı immun cevap ve granülom oluşumunu içerir. Ancak akut Q ateşinden iyileşen hastalarda belirgin proliferatif bir hücre aracılı cevap ortaya çıkmaktadır. Edinilmiş immun cevabın iki kolunu T hücreleri ile antikorların etkinlikleri oluşturur ve Q ateşinin tedavisi için gereklidir (Capo et al., 2012).

T hücreleri, hem hücre içi hem de hücre dışı patojenlerin temizlenmesinde farklı alt grupları ile anahtar rol oynayan hücrelerdir. T hücreleri ürettikleri medyatörler ve yüzeylerindeki reseptör-ligand etkileşimleri ile immün sistemin birçok yolunu düzenleyici etkilere sahiptir. CD4 yüzey markırı eksprese eden T hücreleri hücre dışı patojenleri, CD8 yüzey markırı eksprese eden T hücreleri hücre içi patojenleri kontrol eder. Uyarılmış CD8+ T (CTL) hücreleri, hücre içi organizmalarla enfekte hücreleri doğrudan lize eder. Bir antijenik peptidin CD4+ veya CTL hücresinden hangisini uyaracağına peptidi sunan majör doku uyumluluk kompleksi (MHC) proteinleri belirler. CTL hücreleri, bir MHC molekülü bağlamında sunulan bir antijen tarafından aktive edilmektedir (Başkan, 2013).

T hücrelerinden farklılaşmış olan Th1 (T-helper 1) hücreleri ise makrofajları, doğal öldürücü hücreleri (NK) ve CTL hücrelerini aktifleştirir, intrasellüler patojenlerle savaşır. Th1 farklılaşmasındaki en önemli sitokin IFN- γ ve IL-12'dir. Th1 efektör hücreler; makrofaj, NK hücreleri ve CTL hücrelerini uyaran proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükler. CTL hücreleri ise; IFN- γ , TNF- α ve IL-2 gibi sitokinleri üretir. IFN- γ , makrofaj aktivasyonu için TNF ile sinerjik etki göstererek replikasyonu baskılar ve MHC klas I ekspresyonu tetikler, CTL üzerinde T hücre uyarımını artırır. IFN- γ ile T hücre popülasyonunun ortadan kaldırılması aktivasyon tetikli hücre ölümü (AICD) aracılığı ile gerçekleşir. AICD'nün T hücre yüzeyindeki reseptörü CD95 (Fas)'dir ve birçok immün hücrede eksprese edilen ligandı ile birleştiğinde başlatılır. CD95, TNF reseptör ailesindendir ve uyarıldığında multimoleküler bir kompleks oluşturarak

DNA hasarı ve apoptozise yol açan birçok hücre içi kaspazların aktivasyonunu tetikler (Beyaz, 2004).

Q ateşi enfeksiyonun T hücreleri ile kontrolü farelerde çalışılmıştır. T ve B hücresi eksik SCID (Severe combined immunodeficiency) mutant farelerin, CD4 T ve CD8 T hücreleri ile sulandırması, bir pnömoni modelinde akciğer enfeksiyonunu çözmede başarılı olmuştur. CTL hücrelerinin özellikle konağın enfeksiyona bir tepkisi olan splenomegali kontrolünde önemli rol oynamıştır. Bu tespit, CTL hücrelerinin IFN- γ üretme kabiliyeti ile ilgili olabileceğini ortaya koymuştur. Faz 1 bakterilerin kuvvetli bir Th1 tepkisini ve korumasını indüklediği faz 2'nin ise zayıf bir Th1 tepkisini indüklediği gösterilmiştir. IFN- γ 'nın *C.burnetii* enfeksiyonu korumasındaki rolü, IFN- γ (-) olan farelerdeki yüksek ölüm oranı ile desteklenmiştir. T hücre eksikliğine sahip fareler, dalakta büyük bakteri yükü ve kalıcı klinik hasarlar sergilemiştir. Çalışmalar göstermiştir ki; hem faz 1 hem de faz 2 enfeksiyonlarında T ve B hücrelerinin; bakterinin temizlenmesinde kritik bir rolü vardır. Ayrıca T hücre sitokinleri olan IFN- γ ve TNF enfeksiyonun erken evresinde kilit role sahiptir (Andoh et al., 2007).

T hücreleri ve NK hücreleri tarafından üretilen IFN- γ ; reaktif oksijen ve azot ürünlerinin üretimini indükleyerek fagositik aktiviteyi uyarmak, demirin patojen tarafından kullanılabilirliğini sınırlamak, sınıf 1 ve 2 MHC yoluyla antijen sunumunu uyarmak, TNF gibi sitokinler yoluyla apoptozisi başlatmak gibi patojen replikasyonunu inhibe etme temelli yollar ile mikrobisidal mekanizmaya katkıda bulunur. Akut Q ateşinde görüldüğü gibi IFN- γ geç fagozomlarda, fagozom-lizozom füzyonunu restore eder (Dellasacagrande et al., 1999). Zorunlu hücre içi bakterilerin hayatta kalması için konak hücre ölmemelidir. IFN- γ ; TNF üretimini düzenleyerek, makrofajların fagozom olgunlaşmasını ve enfekte olmuş hücrenin apoptozunu artırarak hücreyi ölüme götürecektir mekanizmayı desteklemektedir. TNF, kaspaz-3 aktivitesini başlatarak, CR3 ve CD54 reseptörleri ile bağlı enfekte makrofajların homotipik yapışmasını sağlar. Yapışma engellendiğinde apoptozis inhibe olur. Bu mekanizma akut Q ateşindeki granülom oluşum mekanizmasını açıklamaktadır. Azalmış IFN- γ üretimi kronik Q ateşinde olduğu gibi mikrobisidal aktiviteyi ve monositlerin toplanmasını bozabilir. IFN- γ ile uyarılmış monositler TNF'yi indükler. TNF fagositozu destekler fakat mikrobisidal aktivitenin diğer aşamalarına katkısı olmaz (Dellasacagrande et al., 2002).

Kronik enfeksiyon; hücre aracılı bağışıklık yanıtı kısıtlandığında ortaya çıkar. Antijen güdümlü lenfoproliferasyon ve IFN- γ sentezi aşağı modüle edilmiştir. Bozulmuş granüloma oluşumu, lenfoproliferasyon ve sitokin ağının değişmesi ile ilişkili monosit mikrobisidal defekt ile seyreden kronik Q ateşinde; düzenleyici sitokin İnterlökin-10 (IL-10)'dur. IL-10 makrofajlar, monositler, dendritik hücreler, lenfositler, B hücreleri, mast hücreleri, eozinofiller ve CD4 hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. Doğal ve adaptif bağışıklığı etkileyen, immunsupresyon ve antiinflamatuvar fonksiyonları vardır. Doğal bağışıklık sırasında inflamatuvar mediatörlerinin üretimini düşürerek; bakteri sağkalımı ve kronik kalıcı enfeksiyonlar için gerekli şartları hazırlar. IL-10; makrofajların mikrobisidal aktivitelerini ve dendritik hücrelerin antijen sunma aktivitesini inhibe etmesinin yanısıra IL-2, IL-3, IFN, MHC II, Th1 sitokinlerinin üretimine ve T hücre polarizasyonuna da müdahale eder (Eldin et al., 2017). Aynı zamanda IL-4 ve IL-13 ve transformik büyüme faktörü (TGF- β) ile birlikte makrofajların polarizasyonunu yönlendirme işlevini paylaşır. IL-10 endokardit ve valvulopatili kronik Q ateşi enfeksiyonlu hastaların monositlerinden elde edilmiştir. TNF'nin aşağı modülasyonunu indükleyerek, monositlerin mikrobisidal aktivitesine müdahale eder. Böylece monositlerde *C.burnetii* replikasyonu kontrollü bir şekilde devam edecektir. Akut enfeksiyonun aksine, kronik formda fagozom lizozom füzyonu bozulmuştur. IL-10'un Q ateşine karşı korumada, hücre aracılı immunitedeki en önemli rolü, kronik Q ateşi sırasında kusurlu hücre aracılı immunité ile ifade edilir. Lenfositler, akut enfeksiyonda olduğu gibi antijene yanıt olarak proliferé olmaz. Endokarditli hastalarda T hücre lenfopeni gözlenmiştir. İmmunsupresyonda; aşırı üretilen IL-10'un T hücrelerinin indüksiyonu yoluyla rol oynayabileceği düşünülmektedir. Kronik enfeksiyonda sitokinlerin ve kemokinlerin kusurlu dengesizliği, immunkompetan hücrelerin transendotelyal kusurlu göçüne sebep olur. IL-10 ve TGF- β , apoptotik hücrelerin yutulması ile makrofaj ve monositleri *C.burnetii* replikasyonuna izin veren M2 polarizasyonuna yönlendirir. Daha sonra IFN- γ ; Q ateşinin kronik süreci sırasında immun deaktivasyonu tersine çevirerek, apoptotik yutulmayı inhibe edip M1 programına doğru polarize ederek replikasyonu önler (Benoit et al., 2008 b; Meghari et al., 2008).

Primer Q Ateşi enfeksiyonunda granulomlar; koruyucu bir bağışıklık tepkisi göstergesidir. Granulomlar, merkezi bir açık alana ve etrafında fibrin halkasına sahiptir. Donut Granulomları adı verilen bu yapılarda infiltrasyonlar, epiteloid morfolojili çok çekirdekli dev hücre yapısında makrofajlardan oluşur. Kronik Q ateşinde granülom oluşumu nadirdir ve infiltre lenfositler ile karaciğerdeki nekroz odakları ile karakterizedir. İlk aşamada monositler granülom oluşumunu indükler, ikinci aşamada T lenfositler granülomun etrafında toplanır. Monositlerin, bakteriyel antijenle hatalı bir şekilde etkileşime girmesi ile çok sayıda hasta granül oluşturmaz (Delaby et al., 2012).

Edinilmiş immün yanıtın ikinci kolu antikorlardır. Q ateşi enfeksiyonunun akut döneminde oluşan antikor yanıtı, antijenin kandan elimine edilmesinde kısmen etkili olmasına rağmen, kronik formda yükselen antikor değeri etkili değildir. Q ateşinde; *C.burnetii*'ye karşı IgM, IgG ve IgA tespit edilebilir. Antikorlar klinik semptomların oluşmasından 2-3 hafta sonra belirlenebilir hale gelir. Akut enfeksiyonda, faz 1 ve faz 2 *C.burnetii*'ye karşı IgM antikorları oluşturulur. Faz 2 bakteriye karşı ise sadece IgG antikorları oluşur ve bunlar 3-6 ay içerisinde hızla azalır. 200 ve üzeri anti faz 2 IgG ve 50 ve üzeri anti faz 2 IgM titresini anlamlıdır. İyileşme dönemi ile birlikte, faz 1 bakteriye karşı üretilen antikorların titresinde düşüş gözlenir. Kronik enfeksiyonda, faz 1 ve faz 2 bakteriye karşı IgG ve IgA antikorları oluşturulur. Ancak faz 1 antikorları daha yüksektir. 800 ün üzerinde anti faz 1 IgG titresini kronik Q ateşi endokarditi için kriter olarak kullanılmaktadır (Roest et al., 2013).

2.6 Klinik Bulgular

Q ateşi, tüm dünyada yaygın olmasına rağmen nadir olarak bildirilir. Enfeksiyonun ortaya koyduğu klinik ve tanısal zorluk nedeni ile birçok ülkede vakaların rapor edilmesine gerek kalmamaktadır. Çok çeşitli konakçı türü arasında bulunmaya devam eder ve düzenli olarak salgınlara yol açar. *C.burnetii*; insanlar tarafından temel olarak aerosol yolla alındıktan sonra farklı klinik tablolar sunan enfeksiyonlarla kendini gösterebilir. Primer enfeksiyon için inkübasyon süresi 2-3 hafta kadardır. Primer enfeksiyondan sonra ortaya çıkan klinik tablo konakçı ve *C.burnetii* suşuna bağlıdır. Hastaların %60'ı enfeksiyonu asemptomatik geçirmektedir. Yaşlı erkekler, genç ve hamile kadınlardan daha sık semptomatik

enfeksiyonları yaşarlar ve çocuklar yetişkinlere göre daha az semptomatiktir. İmmunsupresyonun enfeksiyondaki rolü iyi tanımlanmamıştır. İtalya’da yapılan çalışmalarda enfeksiyon insidensinin, uyuşturucu kullanan ve HIV pozitif hastalarda yüksek olduğunu ortaya koymuş ancak HIV pozitif hastalarla yapılan diğer çalışmalar bu durumu desteklememiştir (Raoult et al., 2005). Ayrıca Fransa Guyanası’nda yaşanan büyük salgında pnömonili hastalarda daha sık bir immunsupresyon öyküsü gösterilememiştir. Enfeksiyona dahil olan *C.burnetii* suşu da klinik belirtilerin önemli belirleyicisidir. Fransız Guyana’sı salgınından sorumlu genotip MST 17, bölgede çok yüksek semptomatik vaka oranlarına sebep olmuştur (Epelboin et al., 2002).

Akut Q ateşi; kendiliğinden sınırlı ateş (grip benzeri sendrom), atipik pnömoni ve hepatit olmak üç ayrı klinik tablo ortaya koymaktadır. Kendiğinden sınırlı ateş, Q ateşi enfeksiyonunda en çok karşılaşılan klinik seyirdir. Ani başlayan ve 40-42 °C'ye kadar çıkabilen ateşe; yorgunluk, myalji ve bağ ağrısı eşlik etmektedir. İki hafta içerisinde ateş normale dönmekte, ancak tedavi edilmeyen yaşlı hastalarda iki ay kadar sürmektedir (Fournier, 1998).

Akut Q ateşinde pnömoni; atipik, hızlı ilerleyen ve ateşli hastada tesadüfen ortaya çıkan pnömoni şeklinde görülebilir. En sık rastlanılan ateşli hastada tesadüfi çıkan pnömonidir. Tipik olarak ateş, öksürük, dispne, oskültasyon anormallikleri ile seyrederken; myalji, şiddetli baş ağrısı, bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal gibi ekstrapulmoner belirtilerden de sıklıkla bahsedilmektedir. Lökosit oranları diğer tip pnömoniler ile karşılaştırıldığında normal veya düşüktür, ancak C-reaktif protein seviyeleri yüksektir. İnspirasyon sırasında duyulan çıtırtı benzeri anormal solunum sesleri (ral) en tipik fiziksel bulgudur. Prognoz, semptomların 30 gün içerisinde çözülmesi ile birlikte olumludur. Mortalite %1’in altındadır (Marrie et al., 2010).

Hepatit; Fransa, Portekiz, İspanya, Tayvan gibi enfeksiyonun endemik seyrettiği ülkelerde pnömoniden daha yaygın akut Q ateşi klinik formudur. Asemptomatik hepatitte tek bulgu karaciğer enzimlerinin iki üç kat yükselmesidir. Hepatomegali ile seyreden akut hepatitte; ateş, titreme, baş ağrısı, anoreksi, nadiren sarılık, ishal, karın ağrısı görülebilir. Akut Q ateşi hepatiti bazen viral hepatitlere benzer bir şekilde sarılıkla birlikte seyredebilir. Nedeni bilinmeyen

ateşli olgularda bazen, karaciğer biyopsisinde tipik fibrinli ‘donut’ granülomlar görülebilir (Oh et al., 2012; Dugdale et al., 2014).

Akut Q hummasında kalp tutulumu %1 civarındadır. Akut perikardit, myokardit ve endokardit şeklinde ortaya çıkabilir. Q ateşinin akut myokardit formuna ilişkin ölüm vakaları bildirilmiştir (Dupont et al., 1992).

Son yıllarda Q ateşi enfeksiyonunda bahsi geçen kronik yorgunluk sendromu; akut enfeksiyonun ardından yorgunluk, terleme, eklem ağrıları, myalji, bulanık görme, efora nefes darlığı gibi belirtilerle ortaya çıkıp yıllarca sürebilen bir hastalık formudur. Bu belirtilerin kronik endokardit ile ayrımı önem taşımaktadır (Gikas et al., 2010).

Q ateşinde kronik enfeksiyon; akut enfeksiyon sonrası (%5) ortaya çıkabileceği gibi, akut hastalık geçmişi olmayan hastalarda da gelişebilir. Q ateşi endokarditi, en sık rastlanan kalıcı *C.burnetii* enfeksiyon tablosudur. Fransa’da kalıcı Q ateşi enfeksiyonlarında en çok bildirilen formdur. Brezilya’da kan kültürü negatif endokardit vakalarının %10’unda; İsrail’de kapak replasmanı yapılan endokarditli hastaların %9,6’sında, Tayland’da endokardit tanısı almış hastaların %8’inde etken olarak *C.burnetii* saptanmıştır (Eldin et al., 2017). Endokardit özellikle kırk yaş üstü erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Bunun yanında altta yatan kalp kapak hastalıkları bulunan; HIV, alkol bağımlılığı, böbrek nakli gibi çeşitli nedenlerle immunsupresif hale gelen hastalarda akut enfeksiyondan yıllar sonra ortaya çıkabilir. Klinik belirtiler spesifik değildir. Tekrarlayan ateş, titreme, gece terlemesi, hepatosplenomegali ortaya çıkabilir. Ani kalp yetmezliği, inme ve embolik bulgular şekillenebilir. Tanıtıcı semptomlarının olmaması nedeniyle geç teşhis edilmesi, ölüm oranının yükselmesine neden olmaktadır. Tedavi görmeyen hastalarda mortalite %60 oranındadır (Stein and Raoult, 1995).

Hollanda’da en sık bildirilen kalıcı Q ateşi formu, vasküler enfeksiyonlardır. Ülkede yapılan bir çalışmada; abdominal aort iliac anevrizması olan hastaların %16,7’sinde *C.burnetii* antikorları saptanmış, bunların %30’unda da serolojik titreler kalıcı vasküler enfeksiyonu düşündürmüştür. Bu enfeksiyonlar; primer enfeksiyondan sonra, bir anevrizma ve vasküler greft gibi damar üzerinde önceden var olan bir lezyon söz konusu olduğunda gelişir. En sık yerleşim yeri abdominal

ve torasik aorttur. *C.burnetii* vasküler enfeksiyonları; latent olduğundan ve başlangıçta kilo kaybı ve nedeni açıklanamayan ateş ile seyrettiğinden, vakaların çoğunda komplikasyon olduğunda tanı koyulabilmiştir. Komplikasyonlar; aortoduodenal fistül, psoas absesi, anevrizma rüptürü ve embolidir. Prognoz çoğunlukla kötüdür, mortalite %18-26 civarındadır (Wegdam et al., 2011).

Q ateşi vakalarının %2'sinde osteomyelit ve osteoartritler görülür. Çocuklarda en sık bildirilen kronik Q ateşi formudur ve multifokal osteomyelit şeklinde seyretmektedir. İmmüsupresif ve eklem protezi bulunan erişkinlerde de gözlemlenebilir. Q ateşinde kronik hepatit durumu ise çoğunlukla endokardit ile ilişkilendirilir. Otuz yaşında erkek bir hastada ilk tanıdan iki yıl sonra patolojik karaciğer anormalliklerinin devam etmesi ile kronikleşen akut hepatit vakası tanımlanmıştır. Akciğer neoplazisini taklit eden kronik akciğer tutulumu da nadir olarak görülmektedir (Maurin, 1999).

Gebelerde Q ateşi çoğunlukla asemptomatiktir. Akut enfeksiyon %0,5'in altındadır. Semptomatik ve asemptomatik primer enfeksiyon, özellikle ilk trimesterde bazı obstetrik komplikasyonlara sebep olmaktadır. Bunlar; plasentit, enfekte fetüs, plasental yetmezlik, spontan düşüklükler, fetal ölüm, malformasyonlar, büyüme geriliği, oligohidroamnios ve erken doğumdur. Gebelikte bağışıklık yanıtının baskılanması enfeksiyonun kronikleşmesinde etkili olmaktadır. Bu durumda sonraki gebeliklerde tekrarlayan düşüklükler yaşanmaktadır. *C.burnetii* anne sütünden ve plasentadan izole edilmiştir (Raoult et al., 2002).

2.7 Teşhis Yöntemleri

Uzun inkubasyon süresi, klinik sunumlarının çeşitliliği ve semptomların özelliiksizliği nedeniyle Q ateşinin tanısı için uygun laboratuvar testleri gereklidir. Enfeksiyonun teşhisinde, etkenin kendisinin ya da komponentlerini tespitine dayalı direkt ve immunitiyi belirleyen indirekt yöntemler mevcuttur (Fournier, 1998).

Direkt bakı; abort yapmış hayvanların dokularından hazırlanmış smear örneklerinden hazırlanan preparatların Gimenez, Macchiavello ve Giemsa boyama tekniklerinden biri ile boyanmasına dayanır. En sık Gimenez yöntemi kullanılmaktadır. *C.burnetii*; abort yapan *Brucella spp.*, *Chlamydia sp.* gibi

etkenlerle karışabileceğinden duyarlılığı düşüktür (Gimenez, 1964; Guatteo et al., 2006). Zorunlu intrasellüler üreme özelliği gösteren *C.burnetii* standart besi yerlerinde üretilemez; fare makrofaj benzeri hücreler, maymun böbrek hücreleri, vero hücreleri, fibroblast hücreleri gibi hücreleri içeren kültür ortamlarında gelişebilmektedir. Ayrıca; kobay ve fare gibi laboratuvar hayvanları ile embriyolu tavuk yumurtası etkenin üretilbildiği in vivo ortamlardır (Fournier et al., 1998). Omsland (2008) tarafından *C.burnetii*'nin metabolik aktivitesinin gözlemlenebildiği hücre içermeyen 'acidified cysteine citrate medium 2 (ACCM2)' adında aksenik üreme ortamları geliştirilmiştir. Bu ortamlarla, hayvan dokuları ve genetik transformasyondan çok daha kolay izolasyon elde edilmiştir. İzolasyon altın standart yöntemdir ancak bakterinin yüksek enfeksiyozitesi göz önüne alındığında oldukça tehlikelidir ve BSL-3 laboratuvar güvenliği gerektirir. Üstelik duyarlılığı oldukça düşüktür. Veteriner ve beşeri hekimlikte rutin tanı için nadiren uygulanır ve pratik değildir (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005).

İmmunohistokimya; monoklonal antikörlerin kullanıldığı İmmunperoksidaz'a dayalı bir boyama yöntemidir. Abort yapmış hayvanların fiske edilmiş plasenta dokularında kullanılmıştır. Ayrıca insan aortik greft, hepatik ve valvüler biyopsi örneklerinde kullanım alanı bulmuş, yardımcı bir yöntemdir (Dilbeck et al.,1994).

İzolasyon tekniklerinin zaman alıcı oluşu ve düşük duyarlılığı ile laboratuvar personeli açısından taşıdığı riskler göz önüne alındığında, günümüzde Q ateşinin tanısında serolojik yöntemler; hem veteriner hem de beşeri hekimlikte önemli yer tutmaktadır. Complement fixation test (CFT), Indirect immunofluorescence assay (IFA), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) Q ateşi tanısında kullanılan serolojik test metotlarıdır. CFT, kronik enfekte hastalarda yanlış negatif sonuçlar vermesi, tavuk yumurtası antijenleri ile çapraz reaksiyona girip yanlış pozitif sonuç vermesi, zaman alıcı olması oluşu gibi nedenler ile günümüzde yerini IFA ve ELISA testlerine bırakmıştır. IFA ve ELISA; Q ateşinin tanısında kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir testlerdir. Beşeri hekimlikte Q ateşinin serodiagnozu için IFA referans yöntemdir (Cowley et al., 1992).

CFT; veteriner sahada halen OIE tarafından önerilen referans test yöntemidir. Geçmişte sıklıkla kullanılmıştır. Ancak ELISA ve IFAT testlerine göre duyarlılığı düşüktür. Çiftlik hayvanlarında abort etkeni olan *Chlamydophila pecorum* ile çapraz reaksiyon verebilmektedir. ELISA ve IFA veteriner sahada da sürü taramalarında; çok sayıda serumun test edilmesinde uygulanmaktadır. Abort yapmış keçi sürülerinde CFT, IFA ve ELISA testlerinin performanslarının karşılaştırıldığı bir çalışmada; IFA ve ELISA sonuçları birbiriyle örtüşmüş ve abortlarla korelasyon göstermiştir, CFT'ye göre çok daha pratik ve duyarlı bulunmuştur (Rousset et al., 2007).

IFA ve ELISA testlerinin tanısal değeri antikor titresi ile ilişkilidir. Enfeksiyondaki antikor oluşumunun, ilk 2-3 haftadan sonra belirlenebilir olması serolojiyi erken teşhis açısından bir dezavantajlı kılar. Serolojik testler veteriner sahada; enfekte vücut sıvıları ve doğum atıkları ile saçılım yaparak enfeksiyon kaynağı olan hayvanları tespit etmede verimsiz kalmaktadır. Etkeni saçan hayvanlar çoğu zaman seropozitif iken bir kısmı saçılım yapmadan seropozitif olabilir ve uzun dönem seropozitif kalabilir. Ayrıca seronegatif olanların bir kısmı saçılıma başlamış olabilir. Özellikle antikorların henüz şekillenmediği erken dönemde PCR güvenilir, pratik ve duyarlı bir teşhis yöntemidir. Beyin omurilik sıvısı, damar grefti, kan, serum, kalp kapakçıkları, cerrahi doku, biyopsi gibi klinik örneklerde, ayrıca süt, dışkı, idrar, atık fetüs, vaginal mukus, plasenta, kene gibi hayvan kaynaklı örneklerde PCR; günümüzde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Berri et al., 2001; Fenollar et al., 2004).

Son yıllarda; klinik örnekler ve hücre kültürlerinde *C.burnetii* DNA'sı saptamaya imkan veren konvansiyonel PCR, Nested PCR ve LightCycler, SYBR green ya da TaqMan kimyasına dayanan Real-time PCR gibi PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Testlerin hedef sekanslarını *sod*, *com1*, *htpAB* gibi kromozomal; *QpH1*, *QpRS* gibi plazmit kaynaklı gen bölgeleri ile *C.burnetii* Nine Mile suşunda 20 kopyada mevcut *IS1111* insersiyon elementinin transpozaz gen bölgesi oluşturmaktadır (Hoover et al., 1992; Klee et al., 2006; Denison et al., 2007).

Immuno PCR; PCR'ın amplifikasyon gücünü ELISA'nın özgüllüğü ile birleştirerek duyarlılığın artmasına imkan sağlayan ilginç bir yöntemdir. Q ateşi

hastalarının serum örneklerinde denenmiş, ELISA ve IFA'ya göre çok daha duyarlı bulunmuştur (Malou et al., 2012).

C.burnetti'ye özel IFN- γ tespiti, yeni bir teşhis metotudur. Tam kanın Q-Vax aşısı veya inaktif Nine Mile suşundan antijenler ile invitro olarak uyarılması ile gerçekleştirilir. IFN- γ üretiminin ölçümü ELISA ile yapılır. Bu yöntemin geçirilmiş ve persiste enfeksiyonun ayrımında yararlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca persiste enfeksiyonun tedavi sürecinin izlenmesinde önerilmektedir (Schoffelen et al., 2013).

2.8 Tedavi

C.burnetii enfeksiyonunun ortaya koyduğu klinik çeşitlilik göz önüne alındığında, her spesifik durum için ayrı bir terapötik seçenek ve takip gerekmektedir. Primer enfeksiyon sonrası temel yaklaşım, komplikasyonlar için risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve kalıcı enfeksiyon ilerlemesini önlemek için profilaktik tedavi seçimidir (Eldin et al., 2017).

Primer enfeksiyon semptomatik olduğunda tetrasiklin grubundan doksisisilin (100 mg/günde iki kez) önerilmektedir. 14 günlük bu tedavinin ilk 3 gün içerisinde başladığında daha etkili olduğu bildirilmiştir. Doksisisilin intoleransı durumunda; minosiklin ve klaritromisin (günde iki kez 500 mg), florokinolonlardan oflasaksin (günde 3 kez 200 mg), peflosaksin (günde 2 kez 400 mg), ko-trimoksazol (160 mg trimetoprim ve 800 mg sulfametoksazol günde 2 kez) alternatiflerdir. Primer enfeksiyon sırasında nörolojik tutulumu olan hastalarda florokinolonlar, cerebrospinal sıvıya iyi penetre olduğu için uygun bir seçim olmaktadır (Gikas et al., 2010).

Çalışmalar, çoğu Q ateşi endokardit vakasının, akut enfeksiyon sonrası ilk 6 ayda ortaya çıktığını göstermiştir. Bu nedenle risk faktörü taşımayanlar dahil akut enfeksiyon geçiren tüm hastalar transtorasik ekokardiyografi ile izlenmeli, kalp kapak lezyonları olanlar 12 ay boyunca tedavi edilmelidir. Lezyon tespit edilmezse, seroloji ile izlenmelidir (Landais et al., 2007).

Kronik Q ateşi vakalarında; bakterinin çoğaldığı fagozomal vakuollerin asiditesi çoğu antibiyotiğin bakterisit aktivitesini inhibe etmektedir. Bu nedenle

C.burnetii öldürülememektedir. Kronik Q ateşinde; Doksisisilin (100 mg/günde 2 kez) ve hidroksiklorokin (200 mg/ günde üç kez) kombinasyonunun en az 18 ay süren uzun süreli bir tedavi prosedürü; önerilmektedir. Hidroksiklorokin fagolizozomlardaki pH'yı artırır ve doksisisilin bakterisit aktivitesini geri kazanır. Bu kombinasyon düşük nüks oranları sağlamakla beraber, geç nüksleri tamamen ortadan kaldırmaz (Maurin, 1999).

Q ateşinin gebelikte tedavisinde; 1.basamak antibiyotikler kontrendike olduğu için kotrimoksazol tek seçenek olarak kalmakta fakat çoğu vakada plasental kolonizasyonu engellememektedir. Beş hafta ve üzeri kotrimoksazol ile tedavide fetal kayıpların önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Doğumdan sonra anne serolojik olarak test edilmeli ve pozitif ise 12 ay boyunca doksisisilin ve hidroksiklorokin ile tedavi edilmelidir (Raoult et al., 2002).

2.9 Korunma

Yapılan çalışmalar, Q ateşinde insan enfeksiyonlarının ana kaynağının çoğunlukla çiftlik hayvanları olduğunu ortaya koymuştur. İlk etapta hayvanlarla direk temas halinde olan kişiler ciddi risk altındadır. Enfeksiyonun kontrolü; enfekte çiftliklerin tespit edilmesine, bakterinin atılımı ile dağılımını azaltmaya, insan maruziyetini önlemeye ve enfeksiyon şüphesinde profilaktik tedavilere başlamaya yönelik tedbirleri kapsar. Bu tedbirler şüphesiz veteriner hekimler ve tıp hekimlerinin işbirliğini zorunlu kılmaktadır (Bielawska et al., 2013).

Enfekte çiftliklerde hasta hayvanların sağlıklılarından ayrılması ve enfekte hayvanlara ait atık fetüs, plasenta, doğum sıvıları ile kirlenmiş altlık, saman gibi ürünlerin uygun şekilde dekontamine edilerek imhası büyük önem taşır. Ancak canlı hayvanlarda salgının tespiti, aerosol bulaşma nedeni ile oldukça zordur. Q ateşinde, *C.burnetii* atılımının azaltılmasına ilişkin; aşılama ve enfekte ruminatların doğumunun engellenmesi, büyük Hollanda salgınında uygulanmış iki önemli kontrol tedbiridir. Aşılama enfekte hayvanlarda etkisizdir ancak henüz enfekte olmamış hayvanlarda abort oranını düşürebilir. Enfekte hayvanlarda antibiyotik tedavisi ise bakteri saçılımını durduramamaktadır (Mori and Roest, 2018).

C.burnetii'nin yüksek sıcaklık, osmotik şok, UV ışığı gibi fiziksel; dezenfektanlar gibi kimyasal streslere son derece dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bakterinin yüzeylerde inaktivasyonu için; %2'lik sıcak NaOH, %2'lik formaldehit, %5'lik fenol, %10'luk klorlu kireç, %5'lik kloroform, %5'lik hidrojen peroksit, %1'lik lysol, %70'lik etanol gibi çözeltiler önerilmektedir. Geniş alanların dekontaminasyonu ise imkansızdır. Bu nedenle enfeksiyonun enfekte çiftliklerden uzaktaki yerleşim yerlerine seyahatinin engellenmesi de önemlidir (Oyston and Davies, 2011).

Meslek grubu olarak risk altında bulunan kişiler Q ateşinin klinik sunumu ve bulaşma şekli ile ilgili mutlaka eğitilmelidir. Birçok ülkede meslek maruziyeti olasılığı bulunan popülasyonların aşılınması koruma önlemleri dahilinde olsa da, tek lisanslı ticari aşı (Q-Vax) Avustralya'da bulunmaktadır. Olası enfekte hastaya müdahale eden hastane çalışanlarının ve teşhis laboratuvarlarında şüpheli hayvan ve insan örneği ile çalışan yetkili personelin; aerosol bulaşma yolunun bertarafı açısından kişisel koruyucu ekipman kullanımına özel dikkat göstermesi, BSL3 şartlarda çalışması önerilmektedir (Anderson et al., 2013).

2.10 Ülkemizde Q Ateşi

Ülkemizde; 1947'de etkenin ilk kez süttten izole edilmesi ile birlikte, Q ateşi enfeksiyonun yaygınlığını saptamak amacıyla hem veteriner hem de beşeri hekimlik alanında çoğu serolojiye dayanan çalışmalar yapılmıştır. Ancak örnek sayısının azlığı, çoğu çalışmanın yerel düzeyde oluşu, duyarlılığı birbirinden çok farklı serolojik tanı yöntemlerinin kullanılmış olması ve enfeksiyon tanısı için kriter bir titre tespit edilemeyişi epidemiyolojik veri ortaya koymayı güçleştirmiştir. Hayvanlar arasında bildirilen ilk ve tek salgın Ankara'da 1952 yılında, koyun ve keçilerdeki abort vakaları ile ortaya çıkmıştır. Bu hayvanların % 90'ının seropozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu vakadan sonra da çalışmalar çoğunlukla çiftlik hayvanlarına yönelik yapılmış, abort yapan hayvanlarda geriye dönük yapılan antikor taramalarına dayandırılmıştır. Ülkemizde halen; *C.burnetii*'nin çiftlik hayvanları, pet hayvanları ve kenelerle saçılımına yönelik, etkenin izolasyonu ya da moleküler tespitine dayalı az sayıda çalışma vardır (Özbey vd., 2009).

İnsanlarda ilk şüpheli klinik vaka 1947 yılında, Ankara’da atipik pnömoni tablosu ile bir doktorda ortaya çıkmıştır. İlk insan salgını 1947’de Aksaray ilinde görülmüştür. Bu salgında, bölge hayvanlarının da enfekte olduğu seroloji ile saptanmıştır. Salgın, kene dışkısı ve bakteri ile bulaşık yünlerin solunması ile ortaya çıkmıştır. Rapor edilen tek ölüm vakası bu salgında yaşanmıştır, vasküler yetmezliği olan yaşlı bir kadındır. Sonraki yıllarda görülen sporadik vakalar ve az sayıda enfeksiyonun tanımlanması, çalışmaların veteriner ve beşeri hekimler iş birliği ile yapılmıyor oluşu, enfeksiyon kaynaklarının değerlendirilmesinde ve epidemiyolojik veri ortaya koymada güçlükler yaratmaktadır. 1951 yılına dek bildirilen Q ateşi vakaları çoğunlukla mesleki maruziyet ve temas ile ilişkilidir. Sonraki çalışmalar Avrupa’da yapılanlar ile paralellik göstermiş, mesleki anlamda riskli olmayan insanlarda da prevalansın arttığı gözlenmiştir (Kılıç, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Çalışmada kullanılan örnekler

Çalışmamızda; Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü sorumluluk alanına giren yedi ilden (Muğla, Aydın, İzmir, Denizli, Manisa, Kütahya ve Uşak) Bakteriyojoloji laboratuvarına gönderilen toplam 100 adet sığır, koyun ve keçi aborte fetüs örneği kullanıldı. Enstitü iş akışı içerisinde; Numune Kabul Bölümü tarafından Veteriner Hekim kontrolünde kabul edilen aborte fetüs örneklerinin nekropsileri Patoloji Bölümü uzmanlarınca yapıldıktan sonra uygun iç organ örneklerinden Bakteriyojoloji Laboratuvarına gönderildi. Laboratuvarında analize alınan bu aborte fetüs iç organ örneklerinden, çalışmamız için steril kaplara alınarak - 40 °C’de saklandı. *Brucella* negatif olan örnekler ayrılarak çalışmaya dahil edildi. İçerisinde *Coxiella burnetii* DNA’sı aranan aborte fetüs iç organ örneklerine ilişkin bilgiler Tablo 3.1 de verilmiştir.

Tablo 3.1 Aborte fetüs iç organ örneklerine ilişkin bilgiler

No	İl	İlçe	Örnek türü	Tarih
1	Aydın	Bozdoğan	Sığır fetüs	2017
2	İzmir	Menemen	Keçi fetüs	2015
3	İzmir	Karşıyaka	Keçi fetüs	2017
4	Uşak	Yapağılar	Koyun fetüs	2017
5	Uşak	Çayyuva	Koyun fetüs	2017
6	Muğla	Köyceğiz	Keçi fetüs	2017
7	Manisa	Selendi	Koyun fetüs	2017
8	Aydın	Bozdoğan	Sığır fetüs	2017
9	Manisa	Selendi	Sığır fetüs	2017
10	Kütahya	Söğüt	Keçi fetüs	2017
11	Manisa	Ahmetli	Koyun fetüs	2017
12	İzmir	Karşıyaka	Keçi fetüs	2017
13	Muğla	Menteşe	Keçi fetüs	2017
14	Manisa	Salihli	Sığır fetüs	2017
15	Aydın	Karacasu	Koyun fetüs	2017
16	Manisa	Akhisar	Koyun fetüs	2017
17	İzmir	Menemen	Koyun fetüs	2017
18	Kütahya	Domaniç	Koyun fetüs	2015
19	Uşak	Yeniköy	Sığır fetüs	2017
20	Uşak	Dışkaya	Koyun fetüs	2017
21	Kütahya	Ahmetoğlu	Koyun fetüs	2017
22	Manisa	Yunusemre	Keçi fetüs	2017
23	Uşak	Karahasan	Koyun fetüs	2017
24	Muğla	Milas	Koyun fetüs	2017
25	Manisa	Akhisar	Koyun fetüs	2017
26	İzmir	Bergama	Koyun fetüs	2017
27	Denizli	Pamukkale	Koyun fetüs	2017

Tablo 3.1 Aborte fetüs iç organ örneklerine ilişkin bilgiler (Devamı)

No	İl	İlçe	Örnek türü	Tarih
28	Manisa	Demirci	Koyun fetüs	2017
29	Muğla	Milas	Koyun fetüs	2017
30	Kütahya	İncik	Koyun fetüs	2017
31	Manisa	Salihli	Koyun fetüs	2017
32	Aydın	Germencik	Keçi fetüs	2017
33	İzmir	Bayraklı	Keçi fetüs	2017
34	Manisa	Soma	Keçi fetüs	2017
35	Manisa	Demirci	Keçi fetüs	2017
36	Uşak	Yeniköy	Koyun fetüs	2017
37	Manisa	Alaşehir	Koyun fetüs	2015
38	Manisa	Salihli	Koyun fetüs	2017
39	İzmir	Ödemiş	Sığır fetüs	2016
40	Denizli	Pamukkale	Koyun fetüs	2016
41	İzmir	Ödemiş	Sığır fetüs	2016
42	Manisa	Sarıgöl	Koyun fetüs	2015
43	İzmir	Bornova	Koyun fetüs	2016
44	Kütahya	Kıranseyh	Koyun fetüs	2016
45	Manisa	Salihli	Koyun fetüs	2016
46	Manisa	Yunusemre	Koyun fetüs	2016
47	Uşak	Eğlence	Sığır fetüs	2016
48	Manisa	Kula	Sığır fetüs	2016
49	Manisa	Ahmetli	Koyun fetüs	2016
50	Muğla	Menteşe	Sığır fetüs	2016
51	İzmir	Foça	Keçi fetüs	2015
52	Muğla	Ula	Sığır fetüs	2016
53	Manisa	Ahmetli	Koyun fetüs	2016
54	Manisa	Salihli	Sığır fetüs	2016
55	Kütahya	Parmakören	Koyun fetüs	2015
56	İzmir	Aliağa	Koyun fetüs	2015
57	Muğla	Köyceğiz	Sığır fetüs	2015
58	Uşak	Gövm	Sığır fetüs	2016
59	Uşak	Kırka	Sığır fetüs	2016
60	Uşak	Sivaslı	Sığır fetüs	2016
61	Muğla	Seydikemer	Koyun fetüs	2015
62	İzmir	Konak	Koyun fetüs	2015
63	İzmir	Torbalı	Keçi fetüs	2015
64	İzmir	Bergama	Koyun fetüs	2016
65	Kütahya	Güveçal	Koyun fetüs	2015
66	İzmir	Torbalı	Koyun fetüs	2015
67	İzmir	Menemen	Keçi fetüs	2015
68	İzmir	Torbalı	Koyun fetüs	2015
69	İzmir	Urla	Keçi fetüs	2015
70	Manisa	Salihli	Sığır fetüs	2016
71	Aydın	Kuşadası	Koyun fetüs	2016
72	Muğla	Bodrum	Sığır fetüs	2016
73	Denizli	Buldan	Keçi fetüs	2016
74	Denizli	Babadağ	Keçi fetüs	2016
75	Uşak	İlyaslar	Sığır fetüs	2016
76	Denizli	Babadağ	Keçi fetüs	2016
77	Uşak	Yapılar	Sığır fetüs	2016
78	Muğla	Fethiye	Keçi fetüs	2016
79	Aydın	Germencik	Sığır fetüs	2016
80	İzmir	Ödemiş	Keçi fetüs	2016
81	Kütahya	Çöğürler	Sığır fetüs	2016
82	Uşak	Güre	Sığır fetüs	2016

Tablo 3.1 Aborte fetüs iç organ örneklerine ilişkin bilgiler (Devamı)

No	İl	İlçe	Örnek türü	Tarih
83	Kütahya	Hisarcık	Keçi fetüs	2016
84	Muğla	Bodrum	Keçi fetüs	2016
85	Kütahya	Altıntaş	Sığır fetüs	2016
86	Muğla	Bodrum	Sığır fetüs	2016
87	Kütahya	Yenice	Sığır fetüs	2016
88	Uşak	Merkez	Sığır fetüs	2016
89	Uşak	Eskisaray	Sığır fetüs	2016
90	Uşak	Kaşbelen	Sığır fetüs	2016
91	Uşak	Koyunbeyli	Sığır fetüs	2016
92	İzmir	Bergama	Keçi fetüs	2016
93	Uşak	Sivaslı	Koyun fetüs	2016
94	Kütahya	Pazarlar	Sığır fetüs	2016
95	Manisa	Şehzadeler	Sığır fetüs	2016
96	Manisa	Bağyolu	Sığır fetüs	2016
97	Uşak	Uçkuyular	Koyun fetüs	2016
98	Muğla	Bodrum	Sığır fetüs	2016
99	Kütahya	Simav	Sığır fetüs	2016
100	Kütahya	Simav	Sığır fetüs	2016

3.1.2 Kullanılan kimyasallar, boyalar ve tamponlar

3.1.2.1 Tris-borik asit-EDTA tamponu (TBE)

Stok solüsyonu (5X) (Sigma)

İçeriği	Miktarı (1L'ye)
Trisma Base	54 g
Borik Asit	27,5 g
EDTA,	20 ml
(pH=8 0.5 M)	
H ₂ O	800 ml

Elektroforez tamponu olarak; TBE buffer 5X stok solüsyonu, 1/10 oranında steril distile su ile sulandırılarak 1X yoğunluğunda kullanıldı.

3.1.2.2 Agarose jel (Sigma)

Çoğaltılmış DNA bölgelerinin kontrolü amacı ile, %1 oranında agaroz içeren jel hazırlandı.

Agarose	1g
TBE (1X)	100 ml

3.1.2.3 Gel red (Biotium)

Elektroforez işleminden önce görüntüleme için jelin boyanmasında Gel red 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jel içerisine 3 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

3.1.2.4 Marker (Fermentas)

Marker olarak 100 bç'lik DNA ladder kullanıldı.

3.1.2.5 Loading dye (Sigma)

Örneğin yoğunluğunu artırarak kuyucuğa eşit dağılmasını sağlamak ve örneğe renk vererek yükleme işlemini basitleştirmek amacı ile loading dye 6x yoğunluğunda hazırlanarak kullanılmıştır.

İçeriği	Miktarı
Bromofenol mavisi	20 mg
Sükroz	5 g
H ₂ O	10 ml'ye tamamlandı

3.1.3 Kullanılan besi yerleri

3.1.3.1 SOC medium (Sigma)

İçeriği	g/L
Tryptone	20
Yeast Extract	5
MgSO ₄	4,8
Dextrose	3,603
NaCl	0,5
KCl	0,186

Plazmite klonlama basamağının, transformasyon aşamasında kullanılmak üzere SOC medium, 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi. Sterilizasyonu, 0.22 µm'lik membran filtreler ile gerçekleştirildi.

3.1.3.2 Luria-bertani (LB) broth (Sigma)

İçeriği	g/L
Pepton	10
Maya ekstratı	5
NaCl	5

Plazmit izolasyonundan önce kültürlerin inkubasyonunda kullanılmak üzere LB broth, litreye 25 g olacak şekilde hazırlandı ve 121 °C’de 15 dk otoklavda steril edildi. Çalışma öncesinde; 0,22 µm’lik membran filtreler ile sterilize edilmiş ampisilin (250 mg/5ml) solüsyonundan 10 µl alınarak, önceden hazırlanmış, otoklavlanmış ve soğutulmuş LB broth ortamına ilave edildi.

3.1.3.3 Luria-bertani (LB) agar

İçeriği	g/L
Pepton	10
Maya ekstratı	5
NaCl	5
Agar	15

LB agar, plazmite klonlama basamağının transforme kültürlerin üretilmesi aşamasında kullanılmak üzere hazırlandı. LB mediuma otoklav edilmeden önce 15 g/l oranında agar (Liofilchem) eklendi ve iyice çözünmesi sağlandı. 121 °C’ de 15 dk otoklavda steril edildi. Çalışma öncesinde; 0,22 µm’lik membran filtreler ile sterilize edilmiş ampisilin (250 mg/5ml) solüsyonundan 400 µl, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) solüsyonundan (100 mM) 1 ml ve X-Gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside) solüsyonundan (80 mg/5ml) 1 ml, önceden hazırlanmış, otoklavlanmış 50 °C’ye kadar soğutulmuş LB agar ortamına ilave edildi. Solüsyonlar agar ortamı içerisinde homojen hale getirildikten sonra besiyeri, petrilere döküldü.

3.1.4 Standart suşlar

Pozitif *C.burnetii* suşu Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilmiştir (NCBI Gen Bankası Erişim numarası: MN917207).

3.1.5 DNA ekstraksiyonu

Hedef DNA'nın ekstraksiyonunda High Pure PCR Template Preparation ticari kiti (Roche) kullanıldı.

3.1.6 DNA amplifikasyonu

3.1.6.1 PCR kiti

Tüm örneklerde *C.burnetii*'nin amplifikasyonu Helix Amp Taq DNA Polymerase kiti (Nanohelix) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.6.2 Konvansiyonel PCR analizinde kullanılan primerler

IS1111 gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primer dizilimleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Üretici firmanın belirttiği doğrultuda primerler DNAaz ve RNAaz ari steril distile su ile sulandırılarak 100 pmol/µl konsantrasyonda stok hazırlandı. Stok primerler kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyonu 10 pmol/ µl olacak şekilde sulandırıldı.

Tablo 3.2 Konvansiyonel PCR analizinde kullanılan primerler

Primer	Primer Dizilimi 5'→3'	Bant Genişliği	Kaynak
Trans 1	5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3'	687 bç	Berri et al., 2000
Trans 2	5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3'		

3.1.6.3 Real -time PCR analizinde kullanılan primer ve proplar

Real-time PCR'da; *C.burnetii* Nine Mile suşunda 20 kopyada tekrar eden transpozaz bölge orijinli *IS1111* ve tek kopyalı korunmuş bir gen bölgesi olan *icd* gen bölgelerine spesifik primerler ve proplar kullanılmıştır. Üretici firmanın

belirttiği doğrultuda primerler DNaz ve RNaz ari steril distile su ile sulandırılarak 100 pmol/μl konsantrasyonda stok hazırlandı. Stok primerler kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyonu 10 pmol/ μl olacak şekilde sulandırıldı. PCR amplifikasyonu için kullanılan primer ve problemlerin dizilimleri Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3 Real-time PCR analizinde kullanılan *IS1111* gen bölgesine spesifik primer ve problemler

Primer ve Prob	Dizilimi 5’→3’	Bant Genişliği	Kaynak
Forward	GTC TTA AGG TGG GCT GCG T	295 bç	Klee et al., 2006
Reverse	CCC CGA ATC TCA TTG ATC AG		
TaqMan Probe	FAM-AGC GAA CCA TTG GTA TCG GAC GTT TAT -TAMRA		

Tablo 3.4 Real-time PCR analizinde kullanılan *icd* gen bölgesine spesifik primer ve problemler

Primer ve Prop	Dizilimi 5’→3’	Bant Genişliği	Kaynak
Forward	CGT TAT TTTA CGG GTG TGS CA	77 bç	Klee et al., 2006
Reverse	GAA TTT TCG CGG AAA ATCA		
TaqMan Probe	FAM- ATA TTC ACC TTT TCA GGC GTT TTG ACCG -TAMRA		

3.1.7 Kullanılan cihazlar

Parçalayıcı (MagNAlyser, Roche)

Hassas Terazı (Sartorius, TE 214 S)

Vorteks (BioCote)

Biyogüvenlik Çalışma Kabini (Healtorce HF Save-1200)

MikroSantrifüj (Hettich Micro 120)

Nanodrop Cihazı (Thermo2000c)

Isıtıcı Blok (Biosan)

Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı (Consort EV243)

Jel Görüntüleme Cihazı (Dual –IntensityTransilluminator)

Gradient Termal Döngü Cihazı (Corbett- Palm Cyclers)

Real Time PCR Cihazı (LightCycler 480)

3.2 Yöntem

3.2.1 Örneklerin DNA ekstraksiyonu için hazırlanması

-40°C’de saklanan örnekler oda sıcaklığına çıkarılarak çözünmesi beklendi. Örneklerden 500 mg miktarında, PBS içeren seramik boncuklu tüplere (MagNA Lyser Green Beads) alındı. MagNA Lyser’da 5000 rpm de 60 sn parçalandı. Daha sonra tüpler iki dk buzda bekletildi (Bu aşamaya; parçalamada hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak ve böylece DNA’nın kırılmasını engellenmek için başvuruldu). Buzdan çıkarılan örnekler oda koşullarında 5 dk bekletildi. Örnekler birkez daha MagNA Lyser’da 5000 rpm de 30 sn parçalandı. Soğutulduktan sonra homojenizattan 200 µl alınıp yeni steril ependorfa aktarıldı.

3.2.2 DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu kit talimatına uygun olarak yapıldı.

1. Örnekler 7,5 µl lizozim ilave edilip 37 °C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı (daha fazla süpernatant alındığında ona göre tamponlar hesaplanır ve eklenebilir).
2. Üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinase K eklenerek karıştırıldı.
4. 10 dk 72 °C’de inkübasyona bırakıldı.
5. Her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle karıştırıldı (DNA’ların çökmesini sağlamak için).
6. Örnek sayısı kadar ‘collection tüp’ çıkartıldı ve her birine filtreli tüp yerleştirildi.
7. Hazırlanan bu karışım collection tüplere aktarıldı. 8000xg’de 1 dk santrifüj edildi.

8. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collection tüplere alındı.
9. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklendi. 8000xg de 1 dk santrifüj edildi
10. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collection tüplere alındı.
11. Her tüpe 500 µl wash buffer eklendi.8000 xg'de 1 dk santrifüj edildi.
12. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collection tüplere alındı.
13. Her tüpe 500 µl wash buffer eklendi. 8000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
14. Collection tüplerdeki sıvı döküldü ve tekrar 3000xg de 10 sn spin yapıldı.
15. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml'lik ependorflara alındı.
16. Her tübe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 72°C'de bekletilmekte olan elution bufferdan 200 µl eklendi (Elution Buffer; filtredeki özel camısı yüzeye bağlanmış olan DNA'yı filtreden ayırıp eppendorf tüpte toplanmasını sağlar) .
17. 8000xg de 1 dk santrifüj yapıldı.
18. Filtreli tüpler atıldı ve DNA'lar ependorflar içinde elde edildi.

İşlem sonunda izole edilen DNA, Nanodrop cihazında kontrol edilerek 260/280 oranı 1,8-2 aralığında değerlendirildi. Uygun miktar ve kalitede elde edilen DNA'lar moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere - 20 °C'de saklandı.

3.2.3 Konvansiyonel PCR çalışmaları

3.2.3.1 DNA amplifikasyonu

Konvansiyonel PCR amplifikasyonu için, reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde ayarlanmış PCR bileşenleri Tablo 3.5'de gösterildiği şekilde PCR tüpüne koyuldu. Saf genomik DNA'lar kalıp DNA olarak kullanıldı. Hazırlanan PCR tüpleri daha sonra termal döngüleme cihazına yüklenip, programlandı. Konvansiyonel PCR çalışmasına ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Tablo 3.6'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5 Konvansiyonel PCR çalışmasında reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktarı
Kalıp DNA	5µl
10X Taq Buffer	5µl
dNTP	1µl
Primer – F	1µl
Primer – R	1µl
5X Tune Up Buffer	10µl
Taq Polimeraz	1,25 unit
Ultra saf su ile 50 µl'ye tamamlandı	

Tablo 3.6 Konvansiyonel PCR termal şartları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk Denatürasyon	1	2 dk	95 °C
Denatürasyon		20 sn	95 °C
Annealing	35	40 sn	55 °C
Elongasyon		45 sn	72 °C
Son uzama	1	5 dk	72 °C
Soğutma		Sınırsız	4 °C

3.2.3.2 Amplikonların elektroforez tankına yüklenmesi

Temiz bir erlen içerisine 100 ml 1xTBE konuldu ve 1g agaroz tartılarak içerisine eklendi. Agaroz süspansiyonu tamamen berraklaşmaya kadar ısıtılarak, agarozun erimesi ve homojenizasyonu sağlandı. Agaroz jel, 45-50 °C'ye kadar soğuyunca içerisine belirtilen miktarda Gel Red ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar uygun şekilde yerleştirildi ve agaroz jelde hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45 dk bekletilerek donması sağlandı. Elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiş jelin yüzeyini kaplayacak biçimde 1XTBE ilave edildi ve ardından taraklar çıkarıldı. 6Xloading dye boyasından pipetin ucuna 3 µl kadar alınıp, 10 µl PCR ürünü ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 10 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

3.2.3.3 Amplikonların elektroforez tankında yürütülmesi

Hazırlanmış olan jelle; marker, pozitif ve negatif kontrol (DNaz, RNaz içermeyen su) ve örneklerin yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 90 volt ve 100 mA'lık akımda 1,5 saat yürütüldü.

3.2.3.4 Görüntüleme ve değerlendirme

Süre sonunda elektroforez sonlandırıldı ve jel dikkatlice küvetten alındı. Jel bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirildi. Trans-I ve Trans-II primerleri için 687 bp uzunluğunda bant arandı. Jel UVP Biospectrum cihazı kullanılarak görüntüledi ve bantlar marker DNA dizisi ile karşılaştırıldı.

3.2.4 Real-time PCR için tespit limiti (LOD) çalışmaları

Real-time PCR için tespit limiti çalışmaları; *C.burnetii*'nin *IS1111* ve *icd* gen bölgeleri için, TA Cloning Kit (Promega) klonlama kiti kullanılarak yapıldı.

3.2.4.1 Plazmite klonlama

Klonlama çalışmasında; *C.burnetii* spesifik gen bölgeleri ligasyon aşamasında plazmit bir vektör ile birleştirilip oluşturulan bu rekombinant DNA transformasyon aşamasında özel *E.coli* hücrelerine aktararak hedef gen bölgelerinin çok miktarda üretilmesi sağlandı. Bu hücreler kültüre edildi. Transforme hücrelerden elde edilen plazmitik DNA, tespit limiti ve kantitasyon çalışmalarında kullanıldı. Klonlama çalışması kit talimatına uygun olarak gerçekleştirildi.

-Ligasyon

Pozitif örneklerden konvansiyonel PCR ürünü elde edildi. Bu amplikonlar insert DNA olarak kullanıldı.

İnsert DNA miktar tayini

Reaksiyona girecek insert DNA miktarı hesaplamada aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{ng insert miktarı} = \frac{50 \text{ ng vektör} \times 0,25 \text{ kb insert DNA}}{3 \text{ kb vektör}} \times \frac{3}{1} = 8,65 \text{ ng insert DNA}$$

Standart reaksiyona, toplamda 8,65 ng DNA ilave edildi. Fazla miktarda DNA, seyreltilti. Ligasyon basamağında kullanılan komponentler ve bileşenleri Tablo 3.7' de gösterilmiştir.

Tablo 3.7 Ligasyonda kullanılan bileşenler ve miktarları

Reaksiyon	Standart Reaksiyon	Pozitif Reaksiyon	Negatif Reaksiyon
Ligasyon tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
Vektör (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR DNA	3 µl	-	-
Kontrol DNA	-	2 µl	-
DNA Ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
Distile su	-	1 µl	3 µl
Toplam hacim	10 µl	10 µl	10 µl

Ligasyon reaksiyonları, 0.5 ml'lik protein tüplerinde gerçekleştirildi. Kullanılan vektör sistemi ve kontrol insert DNA, çalışma öncesinde tüplerin alt kısmında içeriğin toplanması için hafifçe santrifüjlendi. Ligasyon tamponu, kullanımdan önce kuvvetlice vortekslendi. Pipetleme sonrasında karışımlar, +4°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

-Transformasyon

Ligasyon reaksiyonlarını içeren tüpler, içeriğin alt toplanması için santrifüjlendi. Daha sonra, bu tüplerden 2 µl alınarak buz üzerinde bulunan 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Kompetent hücrelerin (Rekombinant DNA'yı almak için özel hazırlanmış *E.coli*) transformasyon etkinliğini saptamak için farklı bir tüpe 0,1 ng kesilmemiş plazmit ilave edildi. Donmuş JM109 Yüksek Etkinlik Kompetent Hücreleri, buz banyosunda çözülene kadar bekletildi. Hücreler hafifçe karıştırıldı. Kompetent hücreler oldukça kırılgan olduğu için aşırı pipetlemeden kaçınıldı. Dikkatli bir şekilde 50 µl hücre, 2 µl'lik ligasyon reaksiyonlarına ilave

edildi, hafifçe karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 20 dk inkübasyona bırakıldı. Hücreler çalkalamalı olmayacak şekilde 42°C'deki su banyosunda 45-50 sn ısı şokuna maruz bırakıldı ve inkübasyon sonrasında, hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 2 dk bekletildi. Ligasyon reaksiyonlarını içeren tüplere 950 µl oda sıcaklığında SOC medium, kesilmemiş plazmit ile transforme olmuş hücreleri içeren tüpe ise 900 µl SOC medium ilave edildi. Tüpler, çalkalamalı olarak (150 rpm) 37°C'de 1.5 saat inkübe edildi. Transformasyon kontrolü için, ekim sırasında SOC medium ile 1/10 oranında dilüsyon önerilmektedir. Eğer yüksek sayılarda koloni elde edilmek isteniyorsa, hücreler 1000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra 200 µl SOC medium içerisinde süspanse edilir ve petrilere bunlardan 100 µl inoküle edilir. Her bir transformasyon kültüründen 100 µl alınarak daha önceden hazırlanmış ampisilin, IPTG ve X-Gal içeren LB agar ortamlarına yayma plaka yöntemi ile inoküle edildi. Petriler 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

IPTG, β -galactosidase geni için bir uyarıcıdır yani eğer ortamda IPTG varsa enzim sentezlenir. X-gal ise laktoz analogu olarak kullanılan ve β -galaktozidaz enzimi tarafından parçalandığında mavi renk oluşturan renksiz, kromojen bir maddedir. Transforme olmayan hücreler antibiyotik direnci içermediklerinden dolayı antibiyotikli besiyerinde hayatta kalamazlar. Plazmit içeren fakat ilgilenilen hedef geni içermeyen plazmidi bulunduran hücreler antibiyotik direncine sahiptir ve antibiyotikli besiyerinde hayatta kalırlar. Fakat plazmit çoklu klonlama bölgesindeki β -galaktozidaz enzimi sentezinden sorumlu *LacZ* geninin bütünlüğü bozulmadığı için ortamda bulunan X-gal maddesini parçalar ve mavi renk oluşturalar. İlgilenilen hedef geni içeren plazmiti taşıyan hücreler ise DNA'daki *LacZ* gen bütünlüğü bozulduğu için X-gal maddesini parçalayacak enzim sentezlenmez ve böylelikle hücreler mavi renk oluşturmaz, beyaz renkli kalırlar.

-Plazmit izolasyonu

İnsert DNA içerdiği düşünülen beyaz koloniler, daha önce hazırlanmış olan ampisilin içeren 5'er ml'lik LB broth besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de çalkalamalı olarak bir gece inkübasyona bırakıldı. Plazmit izolasyonu, üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi.

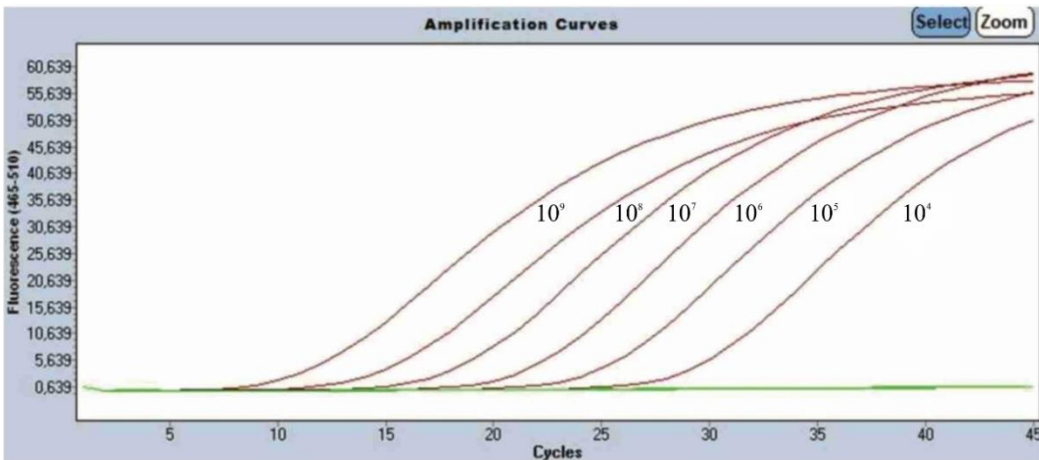
3.2.4.2 Standart eğri oluşturma

IS1111 ve *icd* gen bölgeleri için hedeflediğimiz ampikonlar, ticari kit talimatına uygun olarak plazmitlere klonlandıktan sonra elde edilen plazmitlerden hedef DNA kopya sayısı eldesi için aşağıdaki formül kullanıldı.

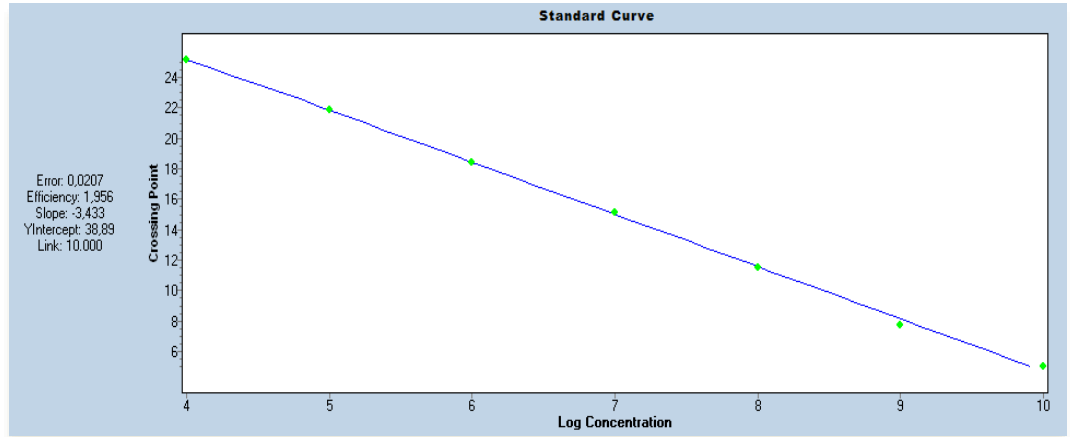
DNA molekül sayısı = Mass (in grams) × Avagadro's Number / Average mol wt. of a base × template length

10^{11} molekül/reaksiyon saptandı. Plazmit DNA'nın 10^{11} standartından 10 µl alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine 90 µl su ilave edilerek ve vorteksenerek 10^{10} standartı oluşturuldu, bu şekilde 10^1 kopya sayısına kadar seri dilüsyonlar hazırlandı. Böylece yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığını belirlemede kullanılacak kontrol plazmitik standartlar elde edildi. Bu standartlar ile Real-time PCR yapıldı. Log fazı sırasında reaksiyonun başındaki kalıp sayısının $\log_{10}$ değeri ile ürünlerin Ct (threshold cycle) değerleri arasındaki doğrusal bir ilişki vardır. Başlangıçta içerdiği hedef DNA sayısı bilinen standartlar ile çalışılarak, bu doğrusal ilişki yardımı ile ait amplifikasyon eğrilerinden “standart eğri” çizildi. Plazmit esaslı standart eğri örneklerdeki DNA kopya sayılarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

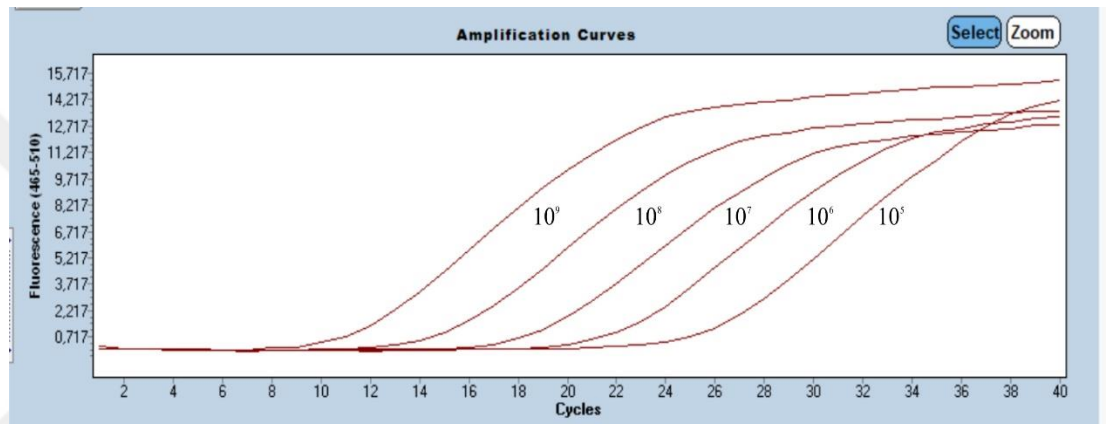
Klonlama çalışması sonucunda elde edilen *IS1111* ve *icd* gen bölgesi plazmitik standartların amplifikasyon eğrileri sırasıyla Şekil 3.1 ve Şekil 3.3’de, standart eğrileri Şekil 3.2 ve Şekil 3.4’de görülmektedir.



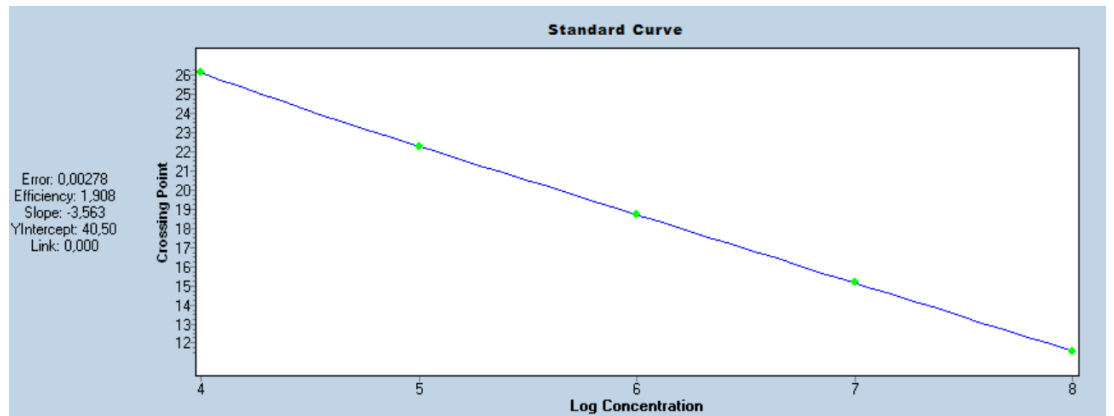
Şekil 3.1 *IS1111* gen bölgesine ait plazmit standartının farklı konsantrasyonlardaki amplifikasyon eğrisi



Şekil 3.2 IS1111 gen bölgesine ait standart eğri



Şekil 3.3 icd gen bölgesine ait plazmit standartının farklı konsantrasyonlardaki amplifikasyon eğrisi



Şekil 3.4 icd gen bölgesine ait standart eğri

3.2.5 Kantitatif Real-time PCR çalışmaları

3.2.5.1 Real-time PCR reaksiyonunda bileşenler ve termal şartlar

Real-time PCR çalışmaları; Klee vd. (2006)'ın önerdiği yöntemle göre her iki gen bölgesi için tüm örneklerde gerçekleştirildi. Çalışmada, her iki gen bölgesine spesifik primerler ve taqman problemleri kullanıldı. Hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlanmış Real-time PCR reaksiyon bileşenleri miktarları Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.8 Real-time PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktarı
Nükleaz free su	6,8 µl
Kalıp DNA	2 µl
Forward Primer (20uM)	0,5 µl
Reverse Primer (20uM)	0,5 µl
Taqman Probe (10uM)	0,2 µl
Enzim ve dNTP mix	10 µl
Toplam	20 µl

Taqman problemleri; 5' ucunda floresan (ışığa veren) özellikte işaretli bir reporter florofor (haberci) boya ile, 3' ucunda ise reporter fluorokromun floresansını prob bütünlüğünü koruduğu sürece absorbe eden bir quencher (baskılayıcı) boya ile işaretlenmiştir. Problemler primerlerin bağlanacağı bölgenin iç kısmına bağlanır. Taq DNA polimeraz, zincir üzerinde polimerizasyon yaparken TaqMan probun 5' ucuna geldiğinde ekzonukleaz aktivitesiyle probu kırar. Böylece probta yer alan reporter ve quencher molekülleri uzaklaştığı için reporter ışığa yapar.

Hazırlanan PCR karışımı Light Cycler 480 cihazına yüklendi. Reaksiyona ait termal koşullar Tablo 3.9'de gösterilmiştir.

Tablo 3.9 Real-time PCR reaksiyon şartları

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon			Cooling
Parametre					
Analiz modu	Yok	Kantifikasyon modu			Yok
Döngü	1	45			1
Hedef [°C]	95	95	57	72	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20
Analiz Modu	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok

3.2.5.2 Veri analizi

LightCycler 480 yazılımı data analizi var yok ve kantitasyon için absolute quantitation second derivative analizi kullanılarak 530 kanalından belirlendi. Plazmitik standart eğri üzerinden her örneğin DNA kopya sayıları Ct değerleri ile hesaplandı.

3.2.6 Dizileme analizi ile çalışmanın verifikasyonu

Real-time PCR analizinde pozitif bulunup, konvansiyonel PCR analizinde negatif bulunan örneklerin dizileme analizleri hizmet alımı ile Altıgen Bio firması tarafından gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1 DNA İzolasyonu, Konvansiyonel ve Real-time PCR Bulguları

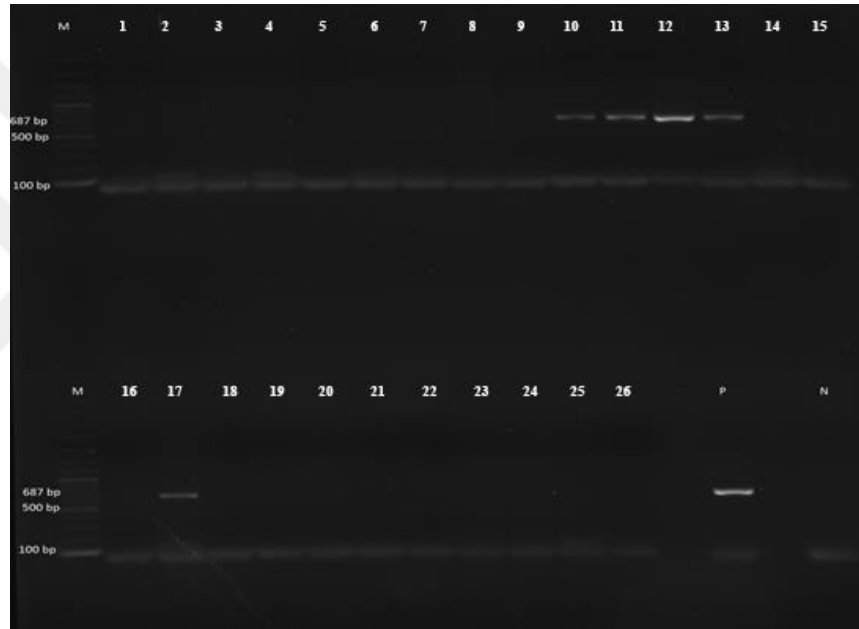
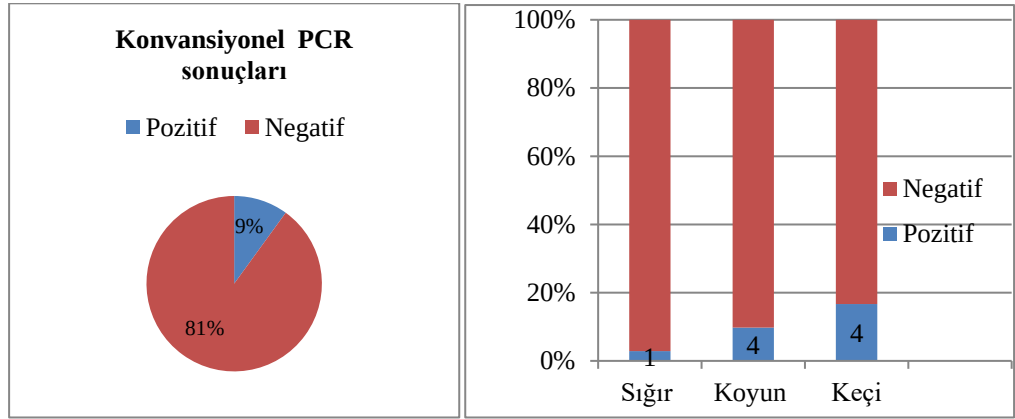
Çalışma sonucu elde edilen DNA izolasyonu, konvansiyonel ve Real-time PCR bulguları Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 DNA izolasyonu, Konvansiyonel ve Real-time PCR sonuçları

Örnek Sıra No	DNA’ların Nanodrop Ölçüm Sonuçları		Konvansiyonel PCR Sonuçları	Real-time PCR Sonuçları / Ct değerleri	
	Saflık 260/280	Konsantrasyon (ng/μl)		IS1111 Bölgesi	icd Bölgesi
10	1,73	23,8	+	+ / 35,23	
11	2,01	11,7	+	+ / 36,01	
12	1,88	12,6	+	+ / 24,82	+ / 31.5
13	1,80	51	+	+ / 35,52	
17	1,75	34,9	+	+ / 34,00	
22	1,75	30,5		+ / 35,83	
40	1,69	28,1		+ / 36,19	
51	1,72	88,4		+ / 34,29	
62	1,65	46,2	+	+ / 26,79	
65	1,94	65,6	+	+ / 29,57	
66	1,58	10,6		+ / 36,00	
67	1,76	64,1		+ / 36,7	
78	1,75	77,6		+ / 33,76	
83	1,71	66,6	+	+ / 32,82	
94	1,82	50,4	+	+ / 31,56	

4.1.1 Konvansiyonel PCR bulguları

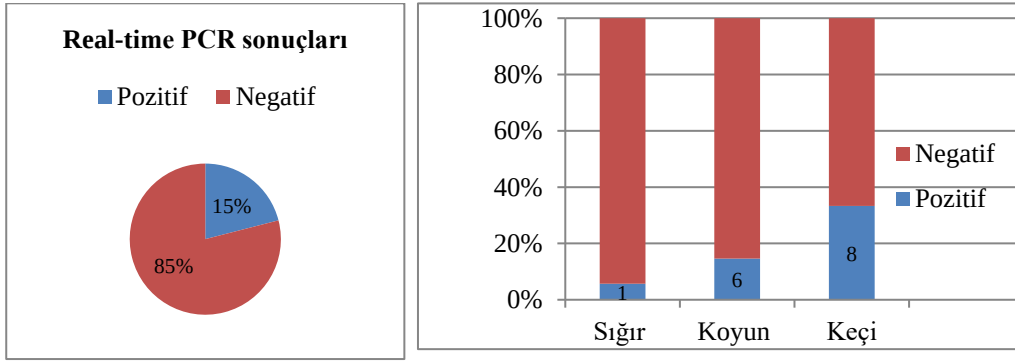
Konvansiyonel PCR yöntemi ile 94 numaralı sığır aborte fetüs örneği (%2,85); 11, 17, 62, 65 numaralı koyun aborte fetüs örnekleri (%9,75) ve 10, 12, 13, 83 numaralı keçi aborte fetüs örnekleri (%16,6) olmak üzere toplam 9 örnek pozitif bulunmuştur Konvansiyonel PCR’da pozitif örnek jel görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



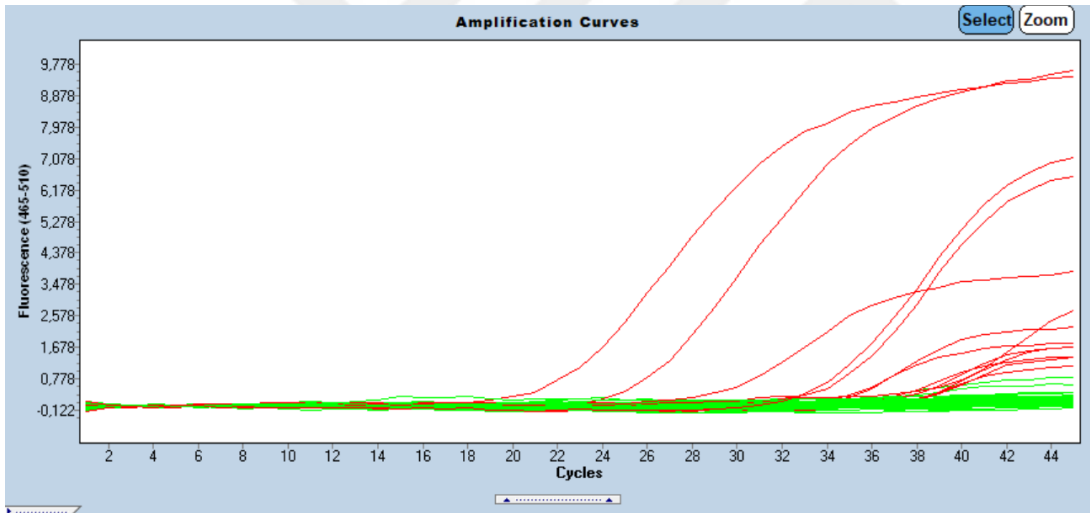
Şekil 4.1 10, 12, 13 numaralı keçi 11 ve 17 numaralı koyun örneklerine ait jel görüntüsü. Kuyucuk 28: pozitif kontrol (687 bp'lik amplikon), kuyucuk 30: negatif kontrol, kuyucuk 1-16: DNA ladder.

4.1.2 Real-time PCR bulguları

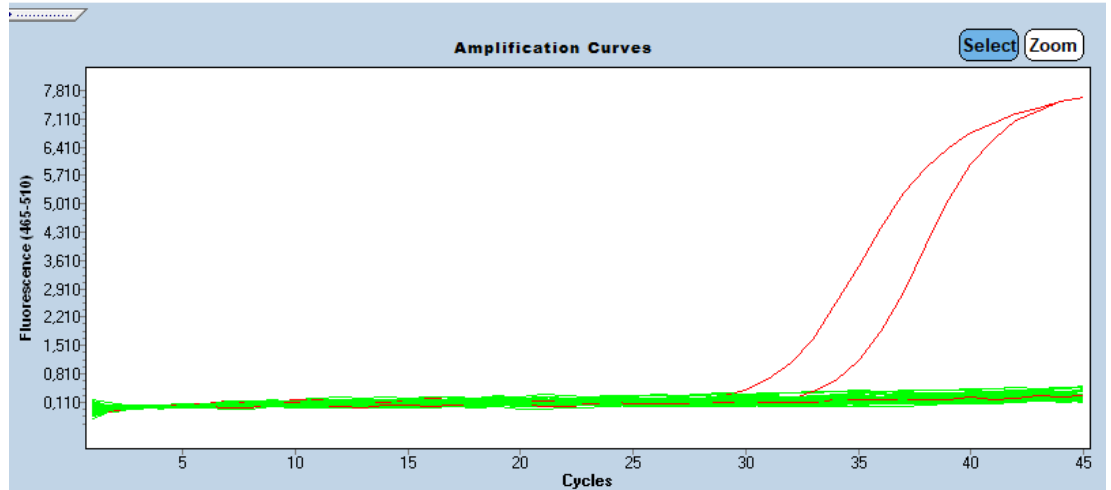
Real-time PCR ile, 94 numaralı sığır aborte fetüs örneği (%2,85); 11, 17, 40, 62, 65, 66 numaralı koyun aborte fetüs örnekleri (%14,6) ve 10, 12, 13, 22, 51, 67, 78, 83 numaralı keçi aborte fetüs örnekleri (%33,3) olmak üzere toplam 15 adet örnek pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4.1)



IS1111 amplifikasyonunda; pozitif örneklerde 25.döngüden önce saptanmaya başlayan, doğrusal ilerleyen floresan eğrisi izlendi (Şekil 4.2). Negatif örnekler ise zigzaklar şeklinde eğriler gözlemlendi. 25.döngüden önce floresan vererek 36.döngüye kadar saptanan örneklerin Konvansiyonel PCR ile de pozitif olduğu görüldü. *Icd* amplifikasyonunda ise pozitif olan tek örneğin 30.döngüden sonra saptanan doğrusal bir floresans eğrisi oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.2 22, 51, 78 numaralı keçi; 62, 65 numaralı koyun örneklerinin *IS1111* bölgesi spesifik Real-time PCR amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.3 12 numaralı keçi örneğinin *icd* bölgesi spesifik Real-time PCR amplifikasyon eğrisi.

4.1.3 Tespit Limiti (LOD) bulguları

DNA konsantrasyonu ve genom uzunluğuna göre hedef kopya sayıları bilinen farklı plazmit dilüsyonlarının amplifikasyon eğrilerindeki Ct değerlerine göre hesaplandı. %95 güven aralığında sinyal oranına dikkate alınarak *IS1111* gen bölgesi ile yapılan çalışmada tespit limiti 10^1 bakteriyel DNA, *icd* gen bölgesi ile yapılan çalışmada ise 10^2 bakteriyel DNA olarak belirlenmiştir.

4.2 Kantitatif Real-time PCR Bulguları

IS1111 gen bölgesi amplifikasyonunda pozitif olan örneklere ait hedef gen kopya sayıları LightCycler 480 cihazının 530 kantifikasyon kanalında hesaplanmıştır. *IS1111* gen bölgesi genomda çok tekrarlı bir bölge olduğundan bulunan değerler yaklaşık hedef kopya sayılarını ifade etmektedir. Real-time PCR ile pozitif olan 15 örnekte; kantifikasyona göre hedef kopya sayıları, 2×10^1 - $5,54 \times 10^5$ gen kopya sayısı/5mg doku örneği değerleri arasındadır. En yüksek değer bir keçi örneğine aittir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Plazmit standartları kullanılarak PCR kantifikasyonuna hedef kopya sayıları

Örnek Numarası	Ct Değeri	Kantitatif Değer (Gen Kopya Sayısı/5mg doku örneği)
10	35,23	$4,01 \times 10^2$
11	36,01	$2,4 \times 10^2$
12	24,82	$5,54 \times 10^5$
13	35,52	$3,64 \times 10^2$
17	34,00	1×10^3
22	35,83	2×10^1
40	36,19	2×10^2
51	34,29	$5,58 \times 10^1$
62	26,79	1×10^4
65	29,57	$1,4 \times 10^3$
66	36,00	$2,38 \times 10^2$
67	36,7	$1,4 \times 10^2$
78	33,76	$8,04 \times 10^1$
83	32,82	$4,2 \times 10^3$
94	31,56	$1,8 \times 10^4$

4.3 Dizileme Çalışması Bulguları

Konvansiyonel PCR ile negatif olup Real-time PCR ile pozitif olan örneklerin dizileri; NCBI genbankasında, MN868468, MN8684670, MN8684671 MN868472, MN868473 erişim numaraları ile kayıt altına alınmıştır. Veri bankasına göre bu pozitif örnekler; akut enfeksiyonlardan sorumlu genomik grupları temsil eden *QpH1* plazmitini içeren, keneden izole edilmiş, Amerika kaynaklı *C.burnetii* Nine Mile RSA 493 suşu ile eşleşmektedir.

5. TARTIŞMA

Q Ateşi çeşitli coğrafi bölgelerde endemik, dünya çapında bir zoonozdur. Enfeksiyonun etkeni *C.burnetii*'nin; çok çeşitli türde hayvan rezervuarını enfekte edebilmesi, yüksek enfeksiyözitesi, enfekte aerosollerin uzun mesafeler boyunca yolculuğu ve çevresel kararlılığı epidemiyolojik çalışmaları güçleştirmiş ve bütün bu özellikleri ile bir biyoterör ajanı olarak değerlendirilmiştir. Koyun, keçi, sığır gibi çiftlik hayvanları; keneler; kedi, köpek gibi pet hayvanları Q ateşi'nin en önemli konakçılarıdır. Hayvanlar enfeksiyonu asemptomatik geçirmekte ancak yüksek miktarda *C.burnetii* içeren doğum ürünleri ve vücut sıvıları ile enfeksiyonun yayılımında rol oynamaktadırlar. Enfeksiyon; bireylere kontamine aerosollerin solunması ile, daha az sıklıkla da kontamine süt ve ürünleri gibi gıdaların tüketimi ile bulaşmaktadır (Anderson et al., 2013.)

Enfeksiyonun teşhisinde; izolasyon yöntemleri uzun, zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca bakterinin oldukça yüksek enfeksiyözitesi nedeni ile BSL-3 düzeyi gerektirir. Seroprevalans, hayvanların daha önce *C.burnetii*'ye maruz kaldığına işaret etmekle birlikte, mevcut saçılımı ve dolayısıyla bulaşma riskini göstermez (Berri et al., 2014). Enfeksiyon odağı olan hayvanları tespit etmede PCR en pratik ve güvenilir yöntemdir. Özellikle *IS1111* gen bölgesi ile yapılan PCR, birden fazla kopyada mevcut olması ve tek kopya hedeflerde duyarlılığı artırması sebebi ile son derece hassastır. Birçok ülkede; veteriner ve beşeri hekimlikte teşhis numunelerinin analizinde PCR başarı ile kullanılmaktadır (Berri et al., 2001; Klee et al., 2006).

Ülkemizde Q ateşi enfeksiyonuna ilişkin yapılan sınırlı sayıda moleküler çalışmada; çiftlik hayvanlarına ait süt, kan, aborte fetüs örnekleri kullanılmış ve bu hayvanların *C.burnetii* saçılımındaki rolü ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Kılıç vd. (2015); Doğu Anadolu Bölgesindeki illerden toplanmış olan 600 adet koyun aborte fetüs örneğini, *sod* gen bölgesini kullanarak PCR ile analiz etmiş ve %2,5 pozitiflik bulmuştur. *Sod* genini hedef alan başka bir PCR çalışmasında da; Küçükalek vd. (2013), Erzurum ilindeki 100 adet sığır aborte fetüs örneğinin %6'sında *C.burnetii* DNA'sı tespit etmiştir. Kırcan vd. (2008), Aydın ili ve çevresinden edinilen 138 adet sığır kan örneğinde, *IS1111* bölgesini hedef aldıkları PCR çalışmasında, %4,3 pozitiflik saptamıştır. Gürbilek vd. (2018); Urfa

ilinde temin edilen 227 adet ruminant aborte fetüs örneği ile çalışmışlardır. *Com1* gen bölgesi ile yapılan PCR çalışmada, sığır örneklerinde %1, koyun örneklerinde %2,7 pozitiflik saptanırken, keçi örnekleri negatif bulunmuştur. Kullanılan ticari Real-time PCR kiti ile aynı pozitiflik oranı belirlenmiştir. Parın (2011) Aydın ili ve çevresindeki ruminant çiftliklerinden almış olduğu 600 adet kan örneğini *IS1111* gen bölgesi hedefli PCR ile analiz ettiği tez çalışmasında; %35,66 oranında *C.burnetii* DNA'sı tespit etmiştir. Ayrıca IFA, ELISA ile sırasıyla %23,3 ve %24,6 seropozitiflik belirlemiştir. *IS1111* bölgesine spesifik primerlerin tercih edildiği diğer bir çalışmada, Elazığ ve komşu illerinden edinilen 70 adet sığır aborte fetüs örneğinde %1,42 oranında *C.burnetii* DNA'sı bulunmuştur (Özkaraca vd., 2016). Günaydın vd. (2014) İç Anadolu ve Karadeniz bölgesinde 102 sığır, 45 koyun ve 5 keçi aborte fetüs mide içeriğinde PCR ile; sığır örneklerinin %3,92'ünde, koyun örneklerinin %11,11'inde ve keçi örneklerinin %40'ında *C. burnetii* DNA'sı bulmuşlardır. Yüz elli iki örneğin 11'inin (%7,23) *C. burnetii* pozitif oluşu, ilişkili abortlar için önemli bir bulgu ortaya koymuştur. Gülmez 2013 yılında Kars ili ve çevresinden elde ettiği 600 adet sığır ve koyun kan ve süt örneğini Elisa testi ile analiz ettiği tez çalışmasında; kan örneklerinde %26,6 ve süt örneklerinde %13'lük seropozitiflik bulmuştur. Ayrıca *IS1111* bölgesi spesifik primerler ile yaptığı PCR'da süt örneklerinde %1 oranında *C.burnetii* saptamıştır. Öngör vd. (2004); Elazığ'da abort sorunu yaşayan ve yaşamayan iki ayrı koyun sürüsünden aldıkları 400 adet süt örneğini immunomanyetik ayırım PCR yöntemi ile analiz etmiştir. *IS1111* bölgesine spesifik primerlerin kullanıldığı çalışmada, abort hikayesi olan hayvanlardan alınan sütlerde %6,5 pozitiflik tespit edilmiştir. Abort yapmamış hayvanların sütlerinde pozitiflik gözlenmemiştir. Can vd. (2015); Hatay'da, 150 adet koyun, keçi ve sığır tank sütünde, *IS1111* gen bölgesini kullanarak uygulanan PCR'da %6 pozitiflik bulmuştur. Kılıç (2017); Elazığ ve çevresindeki koyun ve keçi sürülerinden aldığı süt örneklerinde, *IS1111* gen bölgesi hedefli PCR çalışmasında; abort yapmış koyunlarda %10, keçilerde %3,33 oranında *C.burnetii* yönünden pozitiflik bulmuştur. Abort yapmamış hayvanlardan alınan sütlerde pozitiflik saptanmamıştır.

Ülkemizde yapılan moleküler çalışmalarda *C.burnetii* pozitiflik oranının genel olarak %1-10 arasında olduğu görülürken, çalışmamız sonucu bulduğumuz %9'luk oran bu aralıktadır. Parın'ın (2011) Aydın ilinde bulduğu %35,66'lık

pozitiflik oranı diğer çalışmalara ve çalışmamıza göre oldukça yüksektir. Hayvancılığın oldukça yoğun yapıldığı Aydın ilinde klinik olarak sağlıklı görünen çiftlik hayvanlarında kanda *C.burnetii*'nin gösterilmesi, örneklerin alındığı çiftliklerde yaygın Q ateşi enfeksiyonuna işaret etmektedir.

Payzın ve Akyay 1951'de, Leloğlu ise 1977'de kenelerden *C.burnetii* izole etmiştir. Türkiye Atom Enerjisi Kurumu tarafından 2010'da yapılan çalışmada ise; ülkemizde otuziki ilden toplanan kenelerde *sod* geni PCR'ı ile *C.burnetii* varlığı belirlenmiştir. Ankara ilinden elde edinilen kene gruplarından 1 örnek, Denizli ilinden elde kene gruplarından toplam 26 örnek pozitif saptanmıştır. Çalışmada, RFLP yöntemi kullanılarak kenelerden elde edinilen suşun *C.burnetii* Nine Mile RSA 493 olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda da aborte fetüs örneklerinde aynı *C.burnetii* suşu tespit edilmiştir. Q ateşi enfeksiyonunun önemli bir vektörü olan keneler ile çiftlik hayvanları arasında dolaşan *C.burnetii* suşunun tespitine ilişkin ülkemizde daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Birçok ülkede; çiftlik hayvanlarında *C.burnetii* yaygınlığı konvansiyonel PCR yönteminin kullanıldığı çalışmalar ile belirlenmiştir. Berri vd. (2001); Fransa'da abort sorunu yaşayan 34 adet koyundan alınan serumları ELISA ve IFA ile antikor yönünden analiz etmiştir. Aynı hayvanlardan alınan vaginal svaplarda *IS1111* ile yapılan PCR'da; kuzulamadan 4 gün önce bütün örnekler *C.burnetii* negatif iken kuzulama gününde 15 örnek pozitif bulunmuştur. Sonraki günlerde alınan örneklerde pozitiflik oranı düşmüştür. Vajinal svaplarda; doğumdan sonra 1, 2, 8 ve 70. günlerde sırasıyla pozitiflik oranı %30, 20, 6, 6 olarak belirlenmiştir. Belirtilen günlerde süt ve dışkı örneklerinde saptanan pozitiflik paralellik göstermiştir. Hayvanların yarısının kuzulamadan 5 hafta sonra seropozitif olduğu, üçte birinin ise 9 ay sonra hala seropozitif olduğu görülmüştür. Seroloji, *C.burnetii* saçan hayvanların yarısını tespit edememiştir. Kuzulama gününde genital örneklerde bulunan pozitiflik oranı çalışmamıza kıyasla yüksektir. Yine Fransa'da Berri vd. tarafından (2009) yapılan bir çalışmada; abort problemi yaşayan koyun ve keçi sürülerinden alınan 253 (149 vajinal swap, 5 plasenta, 64 süt, 35 dışkı) adet klinik örnekte, *C.burnetii*'nin de dahil olduğu farklı abort etkenlerinin tespitine yönelik multiplex PCR kullanılmıştır. *C.burnetii* için *IS1111* gen bölgesine spesifik primerlerin kullanıldığı çalışmada; vajinal swap örneklerinin %22,1'i, çiğ süt örneklerinin %17,1'i, dışkı örneklerinin %11,4'ü ve

plasenta örneklerinin %20'si olmak üzere 49 örnekte (%19,3) *C.burnetii* DNA'sı saptanmıştır. Genital örneklerde PCR ile elde edilen pozitiflik oranı, çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

İspanya'da yapılan çalışmada Navarro vd. (2009); abort yapmış 35 koyun ve 23 keçi plasenta örneğinde yaptıkları PCR ile, koyun örneklerinde %11,4, keçi örneklerinde ise %17,4 *C.burnetii* açısından pozitiflik belirlemişlerdir. Çalışmada koyun ve keçi örneklerinde bulunan pozitiflik oranları; çalışmamızda bulunan oranla paralellik göstermektedir.

Clemente vd. (2015); Portekiz'de abort problemi olan 29 sığır, 25 koyun ve 37 keçiden aldıkları plasenta, vaginal svap ve aborte fetüs örneklerinde, *IS1111* gen bölgesi spesifik primerleri ile yaptıkları PCR ile *C.burnetii* DNA'sı aramışlardır. Pozitiflik oranı sığır, koyun ve keçi örnekleri için, sırası ile 5, 9, 15 örnek olmak üzere; toplam 29 örnek (%31,9) olarak ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda sığır örneklerinde daha düşük oranda pozitiflik bulunmuş olmasına rağmen; koyun ve keçi örneklerinde bu çalışma ile yakın pozitiflik oranı elde edilmiştir.

İtalya'da; Masala vd. (2017) abort yapmış koyun ve keçilerden temin ettikleri 315 fetüs (292 koyun, 23 keçi) ve 84 plasenta (76 koyun, 8 keçi) örneğini *sod* gen bölgesini hedef alan PCR ile analiz etmişlerdir. Koyun aborte fetüs örneklerinde, çalışmamızda bulduğumuz pozitiflik oranına yakın olarak %10,9 ve plasenta örneklerinde %9,2 bulunmuştur. Keçi plasenta örneklerinde %12,5 *C.burnetii* tespit edilmiştir. Çalışmamızda keçilerde belirlenen pozitiflik oranı daha yüksektir. Parisi vd. (2006) ise yine İtalya'da 138 sığır ve 376 koyun-keçi aborte fetüs örneğinde, konvansiyonel ve tek tüp Nested PCR tekniği ile yaptıkları çalışmalarında *IS1111* gen bölgesi spesifik primerleri kullanmışlardır. Saptama limiti açısından; tek tüp nested PCR yöntemi konvansiyonel PCR'dan 10-100 kat daha duyarlı bulunmuştur. Pozitif oranı, sığır örneklerinde %11,6 ve koyun-keçi örneklerinde %21,5 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda sığır örneklerinde pozitiflik oranı çok daha düşüktür. Ancak koyun-keçi örneklerinde benzer pozitiflik oranları tespit edilmiştir.

Brezilya'da Oliveira vd. (2018); üreme problemi görülen sütçü keçi sürülerinin plasenta örneklerinde, *IS1111* gen bölgesi ile yapılan Nested PCR ile

%8,7 oranında *C.burnetii* saptamıştır. Çalışmamızda keçi örneklerinde çok daha yüksek pozitiflik oranı elde edilmiştir. Yine Brezilya’da, Mares-Guia vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada keçi, koyun, kemirici, köpek ve kedilerden alınan örnekler; *IS1111* spesifik primerlerinin kullanıldığı, Nested PCR ve konvansiyonel PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. 7 keçi sütü örneğinden 6 adedi, 1 koyun dokusu, 19 köpek kan serumundan 1 adedi, 18 köpek kan örneğinden 1 adedi, 7 kedi anal svap örneğinden 1 adedi her iki PCR yöntemi ile pozitif bulunurken; 74 adet kemirici dalak örneğinden 5 adedi ve 180 kene örneğinden 2 adedi yalnız Nested PCR ile pozitif bulunmuştur.

Hindistan’da organize bir sığır çiftliğinde Q ateşi enfeksiyonunun izlendiği bir çalışmada; sığırlardan süt, serum, vaginal svap; çiftlik çalışanlarından serum örnekleri alınmıştır. Ayrıca çevresel örnekler ve kene örnekleri *C.burnetii* yönünden değerlendirilmiştir. ELISA ile; sığır serumlarında %29,9, sütlerde %26,73 insan serum örneklerinde %84,21 oranında antikor tespiti yapılmıştır. Dhaka vd.(2017); *IS1111* hedefli PCR ile; sığır vaginal svapların %14,73’sini, sütlerin %5,53’ünü pozitif bulmuştur. Kene ve serum örnekleri PCR negatiftir. Sonuçlar çiftlik çalışanlarının kronik *C.burnetii* maruziyetine işaret etmektedir. Çalışmada sığır örneklerinde bulunan PCR pozitiflik oranı, çalışmamızda bulunana kıyasla oldukça yüksektir.

Heidari vd. (2017) İran’da 300 (183 koyun, 117 keçi) aborte fetüs örneğini *IS1111*’e spesifik primerlerin kullanıldığı PCR ile *C.burnetii* yönünden incelemişler; çalışmamızda koyun ve keçi örneklerinde bulunan pozitiflik oranından oldukça düşük olarak, %2 pozitiflik saptamışlardır. Yine İran’da Abiri vd. (2016); *IS1111* primerlerinin kullanıldığı Nested PCR ile 92 koyun ve 60 sığır aborte fetüs örneğinde sırası ile %17,3 ve %25 *C.burnetii* DNA’sı bulmuşlardır. Koyun ve sığır örneklerinde bulunan pozitiflik çalışmamıza oranla yüksektir.

Mısır’da Moein ve Hamza 2017’de yaptıkları çalışmada; abort yapmış 27 koyun, 29 keçi, 26 sığır, 26 buffalonun plasenta ve vajinal akıntı örneklerinde *IS1111* bölgesi ile yapılan Nested PCR ile sadece keçi örnekleri %3.4 oranında pozitif bulmuştur. Keçi örneklerinde pozitiflik oranı, çalışmamızda çok daha yüksektir.

Son yıllarda Real-time PCR yöntemi; duyarlılığı, özgüllüğü, tekrarlanabilirliği, konvansiyonel PCR'daki kontaminasyon riskini ortadan kaldırması ve reaksiyon esnasında amplifikasyonun eş zamanlı olarak izlenmesine imkan vermesi avantajı ile klinik örneklerde *C.burnetii* saptanmasında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Kantitatif PCR (qPCR) ise örneklerde DNA kopya sayısını belirlemeye imkan sağlama üstünlüğüne sahiptir ve özellikle *IS1111* bölgesini hedef alan qPCR en hassas yöntem olarak en sık kullanılan PCR tekniği olma yolundadır (Eldin et al., 2013).

Polonya'da; 279 süt sığırları işletmesinden temin edilen vajinal svap, plasenta, çiğ süt, çiğ tank sütü ve ticari süt ürünlerinden oluşan 1439 örnek analiz edilmiştir. Czerwińska vd. (2019); *IS1111* bölgesini hedefleyen ticari Real-time PCR kiti ile, plasenta örneklerinin %21,74'ünde, vajinal svap örneklerinde ise %11,54 oranında, süt örneklerinde %32,7, tank sütlerinde %39,6 *C.burnetii* DNA'sı saptamıştır. Çalışmamızda; sığır örneklerinde çok daha düşük oranda pozitiflik tespit edilmiştir.

İsviçre'de Schnydrig vd. (2017); 2012 ve 2016 yılları arasında abort yapmış 41 koyun ve 36 keçiden aldıkları toplam 182 örnekte (plasenta ve aborte fetüs iç organ); bakteriyel, fungal ve paraziter abort etkenleri aramıştır. *IS1111* bölgesi kullanılarak yapılan moleküler çalışmalarda Real-time PCR ve end-point PCR karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçları *C.burnetii* açısından dikkat çekicidir. Abort yapan hayvanlardan alınan serum örneklerinde seropozitiflik tespit edilmemişken, fetüs ve plasenta örneklerinde yüksek oranda DNA saptanmıştır. Real-time PCR ile 19 koyun (%46,3) ve 19 (%52,8) keçi örneği *C.burnetii* açısından pozitif bulunurken, end-point PCR'da bu oran %2,4 ve %2,7'dir. Real-time PCR pozitiflik oranları çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre yüksektir ve belirtilen yıllarda ülkede çiftlik hayvanlarında yaşanan *C.burnetii* kaynaklı ciddi abort problemlerine işaret etmektedir.

Kreizinger vd. (2015) tarafından Macaristan'da yapılan çalışmada, abort yapmış koyun, keçi ve sığırlardan alınan plasenta örnekleri qPCR, immunohistokimyasal boyama ve histolojik bakı ile incelenmiştir. qPCR yöntemi tespit eşiği 36,95 Ct değerinde 1 koloni oluşturan birim (CFU) olarak belirtilmiştir. 33 plasenta örneği; hedef gen *IS1111* ile yapılan qPCR analizinde

pozitif bulunmuştur. Sığır örneklerinin %26'sı, koyun örneklerinin %46,7'si, keçi örneklerinde ise %20'sinde *C.burnetii* DNA'sı saptanmıştır. Bu çalışma ile koyun ve sığır örneklerinde belirlenen pozitiflik oranı; çalışmamızdakine oranla çok daha yüksek, keçilerdeki oran ise daha düşüktür.

Tunus'da Barkallah vd. (2018); abort sorunu olan koyun çiftliklerinden aldıkları 164 vaginal svap, 164 kan ve 164 süt örneğini, *IS1111* gen bölgesini hedef alarak, %99,8 spesifite ile qPCR ile analiz etmişlerdir. qPCR etkinliği erime eğrisi analizi ile saptanmıştır. 12 vaginal svap, 5 süt ve 4 kan örneği *C.burnetii* yönünden pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda koyun genital örneklerinde pozitiflik daha yüksektir.

Mısırdaki Abdelfattah vd. (2008) yaptıkları çalışmada 190 koyun-keçi serum ve vajinal svap örneğini kullanmışlardır. Koyun ve keçi örneklerinde Elisa ile %18,4 oranında seropozitiflik belirlenirken, *icd* gen bölgesi spesifik primer ve problemlerin kullanıldığı Real-time PCR %26,3 oranında *C.burnetii* DNA'sı saptanmıştır. Genital örneklerde; aynı gen bölgesi kullanılarak çalışmamızda daha düşük oranda pozitiflik saptanmıştır.

Hindistan'da Vaidya vd. (2010) yaptıkları çalışmada; reproduktif problemler gösteren koyun, keçi, sığır, buffalo türlerinden aldıkları; genital ve fekal svap, süt, idrar ve serum örneklerini *C.burnetti* yönünden değerlendirmişlerdir. Çalışmada; IFA, ELISA, *IS1111* gen bölgesi hedefli konvansiyonel PCR ve SyberGreen temelli Real-time PCR yöntemleri karşılaştırılmıştır. Seroprevalans %13,8 olarak belirlenmiştir. 703 örnekte; konvansiyonel PCR ile 30, Real-time PCR ile 35 örnek pozitif bulunmuştur. Real-time PCR tespit limiti genital örneklerde $6,82-1,21 \times 10^5$ DNA kopya sayısı/μl olarak saptanmıştır. Genital örneklerde pozitiflik %1 düzeyindedir. Çalışmada özellikle sığır süt örneklerindeki %9,5 pozitiflik oranı dikkat çekicidir. Olasılıkla örneklerin alındığı sığırlarda genital yol ile saçılım azalmış ve süt ile uzun soluklu saçılım dönemine girilmiştir. Genital örneklerde tespit limiti bulguları çalışmamızla benzerdir ancak pozitiflik oranı, çalışmamıza kıyasla düşüktür.

İran'da Dehkordi vd. (2012); 782 koyun ve 744 keçi aborte fetüs örneğinde Nested PCR (*com1* genini hedef alan primerler kullanılmıştır) ile sırası ile %12,53 ve %16,39, Real-time PCR (*IS1111* genini hedef alan primerler kullanılmıştır) ile

%15,47 ve %20,43 oranlarında *C.burnetti* DNA'sı saptamışlardır. Real-time PCR, Nested PCR'a göre 1,5 kat daha hassas bulunmuştur. Çalışmamızda keçi örneklerinde daha yüksek pozitiflik tespit edilmiştir.

C.burnetii'nin çiftlik hayvanlarındaki yaygınlığı ile ilgili olarak elde edilen pozitiflik oranları coğrafi bölgeye, hayvan türüne, kullanılan örneğe (plasenta, vajinal svap, aborte fetüs iç organ, süt, idrar ya da dışkı), örneğin alındığı döneme ve yöntemine göre farklılık gösterebilmektedir. Çalışmamızda; Vaidya vd., (2010); Dehkordi vd., (2012) ve Schnydrig vd. (2017) ile paralel bir şekilde ruminant genital örneklerinde Real-time PCR ile konvansiyonel PCR'a kıyasla daha yüksek pozitiflik oranı saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar; sığırlarda, koyun ve keçilere oranla bakterinin vajinal mukus ve dışkı ile saçılımı daha az olduğunu göstermektedir. Bu durum birçok salgında büyük baş hayvanlardan daha fazla koyun ve keçi sürülerinin rol oynadığını açıklar. Ancak tersine sığırlarda, koyun ve keçilere oranla süt ile saçılım daha uzun sürelidir. Asemptomatik koyunlar ise ineklere göre daha az oranda sütle saçılım yapmaktadır (Rodolakis et al., 2007; Guatteo et al., 2006) Çalışmamızda; aborte fetüs örneklerinde pozitifliğin, koyun ve keçilerde sığır örneklerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu bulgu, yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda Real-time PCR ile örneklerin analizinde çok kopyalı *IS1111* ve tek kopya *icd* gen bölgelerine spesifik primer ve proplar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda (Jones et al., 2010; Kreizinger et al., 2015; Vaidya et al., 2010; Magouras et al., 2015; Bruin et al., 2011) *IS1111* bölgesi ile yapılan Real-time PCR'da ruminant genital örneklerinde tespit limitinin, genel olarak 1-10 DNA kopya sayısı arasında olduğu görülmektedir. Tespit limiti açısından, yöntem literatür ile uyumludur.

Duron vd. (2015b) yaptığı çalışmada *IS1111* gen bölgesinin; kenelerde simbiyotik olarak yaşam süren *Coxiella* benzeri bakterilerde (CLB) de bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle kenelerle yapılan; sonrasında sekanslama ile onaylanmayan PCR prosedürlerinde, *C.burnetii*'yi tespit etmek için tasarlanmış *IS1111* primerleri ile CLB'lerin tespit edilmesi gibi önemli bir yanlış tanımlama riski vardır. Ancak bu bakterilerin omurgalı hayvanlara geçişi ve

dokularında üreyebildiğine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Nadiren evcil kuşlarda bildirilmiştir. CLB'lerin ökaryotik hücre kültürlerine de adapte edilemediği gibi, *C.burnetii*'nin sahip olduğu virülans faktörlerine de sahip değildir. Çalışmamızda çok kopyalı *IS1111* bölgesi ile birlikte kullanılan *icd* geni, immunojenik bir dimerik olan izositrat dehidrojenaz enzimini kodlar. Bakterinin asit ortamda yaşama yeteneği ile ilişkili olabilen asit ile indüklenen korunmuş bir gen bölgesidir. Son yıllarda *C.burnetii*'nin genotipik tiplendirilmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Nguyen and Hirai, 1999). Ayrıca, çeşitli klinik örneklerle yapılan PCR çalışmalarında spesifik gen bölgesi olarak da kullanılmaktadır.

IS1111 gen bölgesi temelli Real-time PCR yöntemlerinin, tek kopya gen bölgeleri ile kombinlendiği çalışmalar özellikle Hollandalı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Jones vd. (2011) tarafından Hollanda'da yapılan çalışmada; abort yapmış sığır, koyun ve keçilerden alınan fetal sıvı ve plasenta örnekleri immunohistokimyasal bakı ve *IS1111* gen bölgesi spesifik Real-time PCR analizi ile pozitif ve negatiflikleri belirlendikten sonra Avrupa'da 7 farklı laboratuvara gönderilmiştir. Pozitif örneklerden biri 1/10 ve 1/100 oranında sulandırılmıştır. 1/10'luk dilüe örneği; *IS1111* bölgesi ile tüm laboratuvarlar, *com1* bölgesi ile tek bir laboratuvar tespit etmiştir. 1/100'lük pozitif örneği ise *IS1111* bölgesi ile iki laboratuvar saptamıştır. Bu örnek *icd*, *com1* ve *16 S* gibi tek kopya gen bölgeleri ile hiçbir laboratuvar tarafından belirlenememiştir. Yine Hollanda'da abort yapmış ve yapmamış koyun, keçi, sığırlardan alınmış 93 adet aborte fetüs ve plasenta örneği ile yapılan çalışmada *IS1111* ve *com1* bölgelerine spesifik primerler ve probaların dizayn edildiği Real-time PCR yöntemi kullanılmıştır. Jones vd. (2010), *IS1111* ve *com1* hedefli PCR'da sırası ile %25 ve %20 oranında pozitiflik belirlenmiştir. *Com 1* ile negatif olup *IS1111* ile pozitif olan dört örnek; her iki test tarafından pozitif bulunan örneklerden daha az miktarda *C.burnetii* DNA'sı içermektedir. Hollanda Q ateşi salgını esnasında yapılan diğer bir çalışmada ise; Bruin vd. (2011), farklı koyun ve keçi çiftliklerinden aldıkları 300 adet vajinal svab ve 68 adet alan sürüntü svabı bir multiplex qPCR çalışması ile analiz etmiştir. Hedef gen bölgeleri olarak *icd*, *IS1111*, *com1* kullanılmış, en yüksek Ct değerleri sırası ile 37, 39, 38.7 döngü, tespit limitleri ise sırası ile 13.0, 10.4 ve 10.6 reaksiyon başı kopya sayısı olarak bulunmuştur. Hedef *IS1111*

amplifikasyonunun, tek kopya *com1* ve *icd* amplifikasyonundan yaklaşık üç PCR döngüsü daha önce elde edildiği ve yalnızca *IS1111* pozitif örnekler için Ct değerlerinin birden fazla hedefin amplifiye edildiği örneklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tek kopya hedefleri için bu fark 1 döngüden azdır. *IS1111*; *IS1111+ com1*; *IS1111+ icd* ve *IS1111+ com1+icd* pozitif örnek sayısı sırası ile 90, 33, 18 ve 32 bulunmuştur. Hollanda'da yapılan çalışmalar; *IS1111* bölgesinin tek kopya gen bölgeleri ile kombinlendiği Real-time PCR prosedürlerinde, *IS1111* amplifikasyonunun tek kopya hedeflere oranla çok daha duyarlı olduğu göstermektedir. Klee vd. (2006) kantitasyon çalışmalarının tek kopya gen bölgeleri üzerinden yürütülmesini önermektedir. Ancak çalışmamızda tek kopya gen bölgesi ile sadece bir örnek pozitif bulunduğundan, gen kopya ürünleri genomda çok tekrarlı bölge olan *IS1111* geni ile yapılan kantitatif çalışma ile yaklaşık değerler olarak ifade edilmiştir.

Etken doğum sırasında ve sonrasında doğum ürünleri ve vücut sıvıları ile yüksek miktarlarda atılmaktadır. Aborte olmuş materyalde *C.burnetii*'nin miktarını Real-time PCR ile kantitatif olarak belirleyen sınırlı sayıda literatür bilgisi vardır. Bakterinin yüksek enfeksiyöz özelliği göz önüne alındığında; bu veri çevresel kirlenmenin büyüklüğünü, diğer hayvanlara ve insanlara bulaşma riskini belirlemede önem taşımaktadır. Eski bir çalışmada (Babudieri, 1959) abort sırasında plasenta yolu ile gramda 10^9 'dan fazla bakteri yayılabileceği bildirilmiştir.

Fransa'da gebe olmayan koyunların yumurtalık ve uterus yıkantı sıvılarının (20 adet); ayrıca yumurta kanalı, yumurta ve uterus dokularının (20 adet) örneklendiği çalışmada; Alsaleh vd. (2011) *icd* gen bölgesi spesifik qPCR yöntemini kullanmışlardır. Yıkantı sıvılarında ml'de *C.burnetii* gen kopya sayıları $2,9 \times 10^4$ - $7,5 \times 10^6$; dokularda ise 1×10^2 - $1,5 \times 10^5$ kopya sayısı/mg olarak belirlenmiştir. Çalışma embriyo transferi sırasında bakterinin vericiden alıcıya veya gebelik döneminde embriyo ve fetüse iletilmesindeki riski ortaya koymuştur. Çalışmamızda ise aborte fetüs örneklerinde daha düşük gen kopya sayıları tespit edilmiş ve saçılım düzeyi değerlendirilmiştir.

Almanya'da bir keçi Q fever salgınında, Sting vd. (2013) *C.burnetii* saçılımının değerlendirilmesini qPCR ile yapmışlardır. Çalışmada tek kopya gen

bölgesi *com1* kullanılmıştır. Yöntemin tespit limiti Ct:38 değerinde reaksiyon başı 17 gen kopya sayısı olarak belirlenmiştir. Aşılammamış keçi sürülerinden 3 ay boyunca, 1-4 hafta aralıkla toplam 126 vajinal svap, 111 süt ve 199 kan örneği alınmıştır. İlk örnekleme abortların başlamasından 3 hafta sonra yapılmıştır. İlk örneklemede, bir hafta sonraki 2.örneklemede, iki hafta sonraki 3.örneklemede; (yavrulamanın bittiği tarih) alınan vaginal svaplarda ve sütte bakterinin neredeyse hayvanların tamamında vaginal sürüntü başı 10^4 - 10^8 ve süt ile 10^2 - 10^6 gen kopya sayısı/ml saçıldığı saptanmıştır. Genital örneklerde gen kopya sayıları çalışmamıza oranla yüksektir. Sonraki 7 hafta içerisinde hayvanların %95'inde vaginal sürüntü başı 10^4 , sütle ise 10^2 gen kopya sayısı/ ml'nin altına kadar düştüğü gözlenmiştir.

Kanada'da; Hazlett vd. (2013) 163 koyun ve 96 keçi aborte fetüs ve plasenta örneği ile kapsamlı bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada örnekler; *C.burnetii*'nin de dahil olduğu bakteriyel, viral ve paraziter etkenler yönünden patolojik yöntemler ve Real-time PCR ile değerlendirilmiştir. *IS1111* gen bölgesi spesifik Real-time PCR ile; koyun örneklerinin 113 (%69) adedinde ve keçi örneklerinin 72 (%75) adedinde *C.burnetii* DNA'sı saptanmıştır. Patolojik analizlerde; PCR ile pozitif koyun örneklerinin 11(%10) adedi ve keçi örneklerinin 15 (%21) adedi abortlara sebep olma açısından önemli bulunmuştur. Abortlar ve fetal enfeksiyonla ilişkili bulunan koyun örneklerinde μ l'de ortalama $4,82 \times 10^9$, keçi örneklerinde ise $3,2 \times 10^{10}$ gen kopya sayıları tespit edilmiştir. Patolojik muayeneler sonucu abortlar ile ilişkili bulunmayan koyun örneklerinde $4,55 \times 10^6$, keçi örneklerinde ise $5,68 \times 10^4$ ortalama gen kopya sayıları belirlenmiştir. Gen kopya değerleri çalışmamıza oranla oldukça yüksektir. Çalışma; PCR pozitifliğinin *C.burnetii* bakterisinin saçılım yapan hayvanları belirlediğini ancak abort ve intrauterin enfeksiyondan sorumlu tutulması için tek başına yeterli olmadığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda; *C.burnetii*'nin abortlarda ne ölçüde rol oynadığına dair bir çıkarım hedeflenmemiştir. Çiftlik hayvanları tarafından ne düzeyde saçıldığı üzerinde durulmuştur.

İsviçre'de 100 koyun ve 72 keçi örneğinde; *C.burnetii* seroprevalansı takip etmek ve aborte fetüsler ile saçılan bakteri düzeyini belirlemek temelli bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada Magouras vd. (2015) *C.burnetii* *IS1111* bölgesini

hedefleyen, kantifikasyon standartı içeren bir qPCR ticari kiti kullanmıştır. Tespit limiti; $1-10^2$ bakteri/g düşük pozitif, 10^2-10^4 bakteri/g pozitif ve $>10^4$ bakteri/g yüksek pozitif olarak belirlenmiştir. qPCR yöntemi ile koyun abort örneklerinin % 44,5'u, keçi abort örneklerinin % 44,3'ü pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin % 13,4 ünde en az 10^4 bakteri/g ve daha fazla bakteri sayısı ortaya konmuştur. Bunların % 11,1'i koyun, %16,5'i keçi kaynaklı örneklerdir. Hedef gen kopya sayıları açısından çalışmamızla elde ettiğimiz bulgular daha yüksektir.

Cezayir'de Khaled vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada; 35 koyun-keçi çiftliğinden 227 serum ve 267 genital svap örneği alınmış ve çiftlikler portör ve/veya seropozitif hayvanlar yönünden değerlendirilmiştir. ELISA ile 17 sürüde toplam 32 hayvan (%14.1) seropozitif bulunmuştur. *IS1111* gen bölgesi spesifik Real-time PCR ile 21 sürüde toplam 57 hayvanın (%21,3) *C.burnetii*'yi genital yolla saçtığı belirlenmiştir. Pozitiflik oranı açısından sonuçlar çalışmamızla benzerdir. Aynı zamanda çalışmada, DNA kopya sayıları da değerlendirilmiştir. 267 svap örneğinin 241'inde vajinal svap başına $0-5 \times 10^2$, 8'inde $5 \times 10^2-1 \times 10^3$, 7'sinde $1 \times 10^3-1 \times 10^4$, 6'sında $1 \times 10^4-1 \times 10^6$ aralığında, 5'inde 1×10^6 , 1 koyun örneğinde ise $1,31 \times 10^8$ gen kopya sayısı olarak bulunmuştur. Genital örneklerdeki *C.burnetii* kopya sayıları değerleri çalışmamıza oranla yüksektir.

Rodolakis (2006), aktif enfeksiyondan bahsedebilmek ve *C.burnetii*'nin abort sebebi olarak değerlendirilebilmesi için genital dokularda gram başı 10^4 kopya sayısından fazla olması gerektiğini kişisel görüş olarak belirtmektedir. Çalışmamızda bu standartta uyan tek örnek 12 numaralı keçi örneğidir. Diğer örneklerin de çeşitli miktarlarda *C.burnetii* DNA kopya sayısı içerdiği; çevreye yayılım ile insan ve hayvanlara bulaşma riskini ortaya koyduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ege Bölgesi'nin yedi ilinden elde edilmiş olan 100 adet koyun, keçi ve sığır aborte fetüs örneğinde *C.burnetii* varlığı ve yaygınlığının moleküler yöntemler ile kantitatif olarak belirlenmesinin amaçlandığı bu tez çalışmasında; Konvansiyonel PCR yöntemi ile 9 adet, Real-time PCR yöntemi ile ise 15 adet örnekte *C.burnetii* DNA'sı saptamıştır. Pozitif örneklerden elde edilen suşun dizileme çalışması ile, akut enfeksiyonlardan sorumlu, keneden izole *C.burnetii* Nine Mile RSA 493 olduğu belirlenmiştir.

Real-time PCR çalışmasının kantitasyon basamağı ile; pozitif aborte fetüs örneklerindeki gen kopya sayıları 5 mg'da 2×10^1 - $5,54 \times 10^5$ aralığında tespit edilmiştir. Hedef kopya sayılarının $2,38 \times 10^2$ ve altında olduğu 6 örnek, konvansiyonel PCR ile negatif bulunmuştur. Çalışma sonuçları, örneklerde küçük miktarlarda *C.burnetii* DNA'sı saptamada Real-time PCR'ın konvansiyonel PCR'a göre özgüllük ve duyarlılık açısından üstünlüğünü ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda; Real-time PCR ile aborte fetüs örneklerinde; sığır örneklerinin 1'i (%2.85), koyun örneklerinin 6'sı (%14.6), ve keçi örneklerinin 8'i (%33.3) *C.burnetti* pozitif bulunmuştur. Çalışma bulguları, literatüre benzer bir biçimde *C.burnetii*'nin aborte fetüsler yolu ile saçılımında sığırlara oranla, koyun ve keçilerin daha yaygın zoonotik rezervuarlar olduğunu yansıtmaktadır.

Real-time PCR çalışmasında; çok kopyalı gen bölgesi *IS1111* ile tek kopya *icd* gen bölgesi spesifik primer ve taqman problemleri kullanılmıştır. *IS1111* gen bölgesi amplifikasyonu tek kopyalı *icd* gen bölgesi ile yapıldığına göre çok daha duyarlı bulunmuştur. Tek kopya *icd* amplifikasyonu ile yapılan Real-time PCR; *IS1111* ile pozitif bulunan 15 örnek içerisinde sadece yüksek miktarda *C.burnetii* hedef kopya içeren içeren ($5,54 \times 10^5$) bir keçi örneğini saptayabilmiştir.

Q Ateşi'nin teşhisi; uzun süreli inkübasyon süresi ve enfekte olmuş aerosollerin uzun mesafeler boyunca seyahat etme kabiliyetine bağlı olarak, epidemiyolojik birliktelik eksikliği ve semptomların özelliksizliği nedeniyle sıklıkla geciktirilir veya yanlışır. Laboratuvar tanısı, enfeksiyonun doğru döneminde yapılan, hem serolojik hem de patojen belirleyen farklı yöntemler ile edinilen sonuçların yorumlanmasına dayanmaktadır. Çalışmalar; bakteriyi saçan

hayvanların önemli bir kısmının seronegatif olduğunu ayrıca bakteri saçılım oranının abort geçmişinden bağımsız olduğu ve saçıcı hayvanların önemli bir kısmının da klinik olarak yetersiz enfeksiyonları temsil edebileceğini ortaya koymaktadır. Bakteri, sistemik antikor cevabını indüklemeyen uterus ve plasentada lokalize olabilmektedir. Hayvan popülasyonlarında *C.burnetii* serolojisi; enfeksiyonun durumu ile ilgili eksiksiz bir tablo sunmamaktadır. Ancak sürü düzeyinde ön enfeksiyon araştırması yapmak için yararlıdır. Persiste enfekte ve uzun yıllar kalıcı olarak seropozitif kalabilen ineklerde olduğu gibi, patojen tespiti için olumsuz olan testlerde seroloji değerli sonuçlar verebilmektedir. Sürü seviyesinde seropozitiflik tespit edildiğinde ya da serolojik yanıt olmamasına rağmen şüphe varsa saçıcıları izlemede tercih edilecek yöntem özellikle enfeksiyonun ilk iki haftasında daha verimli sonuçlar veren PCR'dır.

Ülkemizde; veteriner ve beşeri hekimlik alanında yapılan çalışmalar Q ateşinin varlığını, hayvan ve insan sağlığı üzerinde yarattığı riskleri ortaya koymaktadır. Çalışmamız; ülkemizde çiftlik hayvanları ile *C.burnetii* saçılımını kantitatif anlamda yansıtan ilk moleküler çalışmadır. Çalışma bulguları; tanısal PCR'da tüm dünyada yaygın olarak kullanılan genomda çok tekrarlı *IS1111* gen bölgesi spesifik primerlerin ve spesifikiteyi büyük oranda artıran hidroliz problarının kullanımı ile dizayn edilen, kantitasyon aşamasında klinik örneklerde hedef gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçülmesine imkan veren Kantitatif Real-time PCR'ın; Q ateşi enfeksiyonunun veteriner sahada tanı ve takibinde, enfeksiyon odağı olan hayvanların tespitinde uygulanması son derece pratik, hassas ve üstün bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bu yönleri ile yöntem, diğer araştırmacılara da önerilmektedir.

Çalışmada edinilen bilgi; çevresel kontaminasyonunun yanısıra insan ve diğer hayvanların maruziyet riskine ilişkin bölgesel bir resmi sunmaktadır. Ancak ülkemizde *C.burnetii*'nin yayılımını ve insanlarda oluşturduğu akut ya da kronik hastalık sıklığını belirlemek, epidemiyolojiyi tespit etmek, aynı zamanda hayvan popülasyonlarında sebep olduğu abort olaylarını tahlil etmek için veteriner ve beşeri hekimlerin birlikte rol aldıkları, iyi tasarlanmış daha fazla ülkesel araştırmaya ihtiyaç vardır. Zira; insan, hayvan ve çevre sağlığını optimize etmek için çoklu disiplinlerin çabalarını ifade eden 'tek sağlık' yaklaşımı için Q ateşi çok iyi bir örnektir.

Q ateşı enfeksiyonunun taşıdığı hayvan ve halk sağlığı riskleri; ithal hayvan ve hayvan ürünlerinin ülkedeki dolaşımının kontrolü, çiftliklerde doğum ve doğum sonrası dönemde özel dezenfeksiyon ve kişisel koruyucu tedbirlerin alınması, enfeksiyonun tespit edildiği çiftliklerde sıkı izolasyon ve eradikasyon uygulanması ve çiftlik hayvanlarında aşılama çalışmalarının başlatılması gibi kapsamlı tedbirlerin, genel koruma ve kontrol programlarına dahil edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.





KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Moein, K.A., Hamza, D.A.**, 2017, The burden of *Coxiella burnetii* among aborted dairy animals in Egypt and its public health implications, *Acta Tropica*, 166, 92–95 pp.
- Abiri, Z., Khalili, M., Rad, M., Sharifi, H.**, 2016, Detection of *Coxiella burnetii* in Aborted Fetuses of Cattle and Sheep Using Polymerase Chain Reaction Assay in Mashhad City, Iran, *Int J Enteric Pathog.*, 4(1), e33170.
- Abdelfattah S., Abdelfattah A., Samar M.M.**, 2018, Molecular and serological data supporting the role of Q fever in abortions of sheep and goats in northern Egypt, *Microbial Pathogenesis*, S0882-4010(18)31448-7.
- Abnave, P., Muracciole, X., Ghigo, E.**, 2017, *Coxiella burnetii* Lipopolysaccharide: What Do We Know?, *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 2509 p.
- Agerholm, S.J.**, 2013, *Coxiella burnetii* Associated Reproductive Disorders in Domestic Animals-A Critical Review, *Acta Veterinaria Scandinavica*, Denmark, 55:13 p.
- Alsaleh, A., Pellerina, J.L., Rodolakis, A., Larrat, M., Cochonneaub, D.**, 2011, Detection of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in oviducts and uterine flushing media and in genital tract tissues of the non pregnant goat, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34, 355–360 pp.
- Amano, K., Williams J.C., McCauland, T.F., Peacock, M.G.**, 1984, Biochemical and Immunologica Properties of *Coxiella burnetii* Cell Wall and Peptidoglycan-protein Complex Fractions, *J. Bacteriol.*, 160: 982–988 pp.
- Amara, B.A., Bechah, Y., Mege, J.L.**, 2012, Immune Response and *Coxiella burnetii* Invasion, Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science+Business Media Dordrecht, Ch: 15, 287-297 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Andoh, M. and Zhang, G.,** 2007, T Cells are Essential for Bacterial Clearance, and Interferon- γ , Tumor Necrosis Factor and B Cells are Crucial for Disease Development in *Coxiella burnetii* infection in Mice, *Infect. Immun.*, 75:3245–3255 pp.
- Anonim** Erişim adresi:<https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
Erişim tarihi: 18.09.2019
- Anonim** Erişim adresi:<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/riskassessment-q-fever> Erişim tarihi :19.09.2019
- Anonim** The Community Summary Report On Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Out Breaks in the European Union in 2008, *EFSA Journal* 8(1): 241–247 pp.
- Arricau-Bouvery, N. and Rodolakis, A.,** 2005, Is Q fever an Emerging or Re-emerging Zoonosis?, *Vet. Res.*, France, 36, 327-349 pp.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer. H.,** 2006, Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by In frequent Restriction site-PCR and MLVA typing, *BMC Microbiol.*, 6:38.
- Babudieri, B.,** 1959: Q fever: a zoonosis, *Adv. Vet. Sci.*, 5, 81–182 pp.
- Baca, O.G., Klassen, D.A., Aragon, A.S.,** 1993, Entry of *Coxiella burnetii* Into Host Cells., *Acta Virol.*, New Mexico, 37:143–155 pp.
- Barkallaha, M., Gharbia, Y., Hmania, M., Mallekb, Z., Gautierc, M.,** 2018, Serological and molecular evidence of coxiellosis and risk factors in sheep flocks in central-eastern Tunisia, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, (57) : 15–21pp.
- Başkan, E.B.,** 2013, T hücre İmmunitesi, *Türkderm*, 47: Özel Sayı 1: 18-23 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Beare, P.A., Gilk, S.D., Larson, C.L., Hill, J., Stead, C.M, Omsland, A.,** 2011, Dot/Icm Type IVB Secretion System Requirements for *Coxiella burnetii* Growth in Human Macrophages, *M.Bio.*,(4),e00175-11 pp.
- Beare, P.A., Jeffrey, M.B., Long, C.M., Martens, C.M., Heinzen, R.A.,** 2018, Genetic mechanisms of *Coxiella burnetii* Lipopolysaccharide Phase Variation, *PLOS Pathogens*, 14(3): e1006922.
- Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A.,** 2006, Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons, *J.Bacteriol*, 188:2309–2324 pp.
- Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Stacey, D., Gilk, S.D.,** 2009, Comparative Genomics Reveal Extensive Transposon-Mediated Genomic Plasticity and Diversity Among Potential Effector Proteins with in the Genus *Coxiella*, *Infection and Immunity*, Vol. 77, No. 2, 642–656 pp.
- Benoit, M., Barbarat, B., Bernard, A.,** (2008a), *Coxiella burnetii*, The Agent of Q fever, Stimulates an Atypical M2 Activation Program in Human Macrophages, *Eur. J. Immunol.*, 38:1065–1070 pp.
- Benoit, M., Ghigo, E., Capo, C.,** (2008b), The Uptake of Apoptotic Cells Drives *Coxiella burnetii* Replication and Macrophage Polarization: a Model for Q fever Endocarditis, *PLoS Pathog*,4:e1000066.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, R., Rodolakis, A.,** 2001, Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep, *Veterinary Record*, 148, 502-505 pp.
- Berri, M., Karine 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, *Veterinary Microbiology*, 72, 285-293 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berri, M., Rekiki, A., Boumedine, K.S., Rodolakis, A.,** 2009, Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR, *BMC Microbiology*, 9:130 p.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A.,** 2001, Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec*, 148: 502-505 pp.
- Beyaz, F.,** 2004, T Lenfositlerin gelişimi, Fonksiyonları ve Histokimyasal Özellikleri, *Erciyes Üniv. Fet. Vak. Derg.*, 1(1): 61-66 s.
- Bielawska-Drózd A., Cieślík P., Mirski T., Bartoszcze, M., Knap, J.P., Gawel, J., Żakowska, D.,** 2013, Q fever--selected issues, *Annals of Agricultural and Medicine*, Poland, Vol.20, No: 2, 222-232 pp.
- Blut, A.,** 2014, *Coxiella burnetii* – Pathogenic Agent of Q (Query) Fever, *Transfus. Med. Hemother*, Germany, 41:60–72 pp.
- Bruin, A., Groot, A., Heer, L., Bok, J., Wielinga, P.R., Hamans, M., Rotterdam, J.V.B., Janse, I.,** 2011, Detection of *Coxiella burnetii* in Complex Matrices by Using Multiplex Quantitative PCR during a Major Q Fever Outbreak in The Netherlands, *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol. 77, No. 18, 6516–6523 pp.
- Burnet, F.M. and Freeman, M.,** 1937, Experimental Studies on the Virus of Q fever, *Med. J. Aust.*, Australia, 2:299–302 pp.
- Can, H.Y., Elmalı, M., Karagöz, A.,** 2015, Detection of *Coxiella burnetii* in cows, goats, and ewes bulk milk samples using polymerase chain reaction (PCR), *Mljekarstvo*, 65, 26-31 pp.
- Capo, C. and Mege, J.L.,** 2012, Role of Innate and Adaptive Immunity in the Control of Q Fever, Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science+Business Media Dordrecht, Ch: 14, 273-284 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Capo, C., Lindberg, P., Meconi, S.P., Zaffran, Y., Raoult, D., Louis, J.,** 2019, Subversion of Monocyte Functions by *Coxiella burnetii*: Impairment of the Cross-Talk Between α v β 3 Integrin and CR3, *J. Immunol.*, USA., 163:6078–6085 pp.
- Czerwińska, S.M., Jodelko, A., Marchewka, K.Z., Niemczuk, K.,** 2019, Shedding and genetic diversity of *Coxiella burnetii* in Polish dairy cattle, *PLoS ONE*, 14(1): e0210244.
- Castrejón-Jiménez, N.S., Leyva-Paredes, K., Hernández-González, J.C., Luna-Herrera, J., García-Pérez, B.E.,** 2015, The Role of Autophagy in Bacterial Infections, *BioScience Trends*, Japan, 9(3):149-159 pp.
- Chmielewski T. and Wierzbanska, S.T.,** 2011, Inhibition of Fibroblast Apoptosis by *Borrelia afzelii*, *Coxiella burnetii* and *Bartonella henselae*, *Polish Journal of Microbiology*, Poland, Vol. 60: 269–272 pp.
- Chmielewski, T. and Tylewska, S. W.,** 2012, Q Fever at the Turn of the Century, *Polish Journal of Microbiology*, Poland, Vol. 61, No 2, 81–93 pp.
- 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, *Veterinary Record* , 164, 373-374 pp.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Cockrell, D.C., Voth, D.E., Howe, D.,** 2007, Proteome and Antigen Profiling of *Coxiella burnetii* Developmental Forms, *Infect. Immun.*, USA., 75:290–298 pp.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J., Heinzen, R.A.,** 2004, Temporal Analysis of *Coxiella burnetii* Morphological Differentiation, *J. Bacteriol.*, USA., 186:7344–7352 pp.
- Cowley, R., Fernandez, F., Freemantle, W., Rutter, D.,** 1992, Enzyme immunoassay for Q fever: comparison with complement fixation and immunofluorescence tests and dot immunoblotting, *J. Clin Microbiol.*; 30(9): 2451–2455 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cox, H.R. and Bell, E.J.**, 1939, The Cultivation of *Rickettsia diaporica* in Tissue Culture and in the Tissues of Developing Chicken Embryos, *Public Health Rep.*, USA., 54:2171–2175 pp.
- Crabill, E., Schofield, B., Newton H. J., Goodman, A. L., Roy, C. R.**, 2018, Dot/Icm-Translocated Proteins Important for Biogenesis of the *Coxiella burnetii*-Containing Vacuole Identified by Screening of an Effector Mutant Sublibrary, *Infect Immun.*, USA., vol:86, 758 p.
- Davis, G.E, Cox, H.R.**, 1938, A filter-passing Infectious Agent Isolated from Ticks, Isolation from *Dermacentor andersoni*, Reactions in Animals, and Filtration Experiments, *Public Health Rep.*, USA., 53:2259–2261 pp.
- Dehkordi, F.S. and Rafsanjani, M.S.**, 2012, Prevalence study of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of small ruminants in various partum and seasons in Iran, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(27), 5594-5600 pp.
- Delaby, A., Gorvel, L., Espinosa, L.**, 2012, Defective Monocyte Dynamics in Q fever Granuloma Deficiency, *J. Infect. Dis.*, 205:1086–1094 pp.
- Dellacasagrande, J., Ghigo, E., Machergui-El Hammami, S., Toman, R.**, 2000, Alfa (v), avb3 Integrin and Bacterial Lipopolysaccharide are Involved in *Coxiella burnetii*-Stimulated Production of Tumor Necrosis Factor by Human Monocytes. *Infection and Immunity*, USA., 5673–5678 pp.
- Dellacasagrande, J., Ghigo, E., Raoult, D.**, 2002, IFN- γ Induced Apoptosis and Microbicidal Activity in Monocytes Harboring the Intracellular Bacterium *Coxiella burnetii* Require Membrane TNF and Homotypic Cell Adherence, *J. Immunol.* 169:6309–6315 pp.
- Denison, A., Thompson, H., Massung, R.F.**, 2007, *IS1111* Insertion Sequences of *Coxiella burnetii*: Characterization and Use for Repetitive Element PCR-based Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates, *BMC Microbiol.*, 7:91p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Derrick, E. H.**, 1937, “Q” fever, New Fever Entity: Clinical Features, Diagnosis and Laboratory Investigation, *Med. J. Aust.*, Australia, 2:281–299 pp.
- Dhakaa, P., Rawool, B.D., Malika, S.S., Yadava, P.J., Kumar, M., Baranwal, A.**, 2017, Seroprevalence and molecular detection of coxiellosis among cattle and their human contacts in an organized dairy farm, *Journal of Infection and Public Health*- 943p.
- Dijkstra, F., Van der Hoek, W., Wijers, N., Schimmer, B., Rietveld, A., Clementine, J.**, 2012, The 2007–2010 Q fever epidemic in the Netherlands: Characteristics of Notified Acute Q Fever Patients and the Association with Dairy Goat Farming, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 64, 3–12 pp.
- Dilbeck, P.M. and McElwain, T.F.**, 1994, Immunohistochemical detection of *Coxiella burnetti* in formalin-fixed placenta, *J. Vet Diag Invest.* 6, 125-127 pp.
- Drancourt, M., Raoult, D.**, 2005, Genus I. *Coxiella*, In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds), *Bergey’s manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2, The *Gammaproteobacteria* 2nd ed. Springer-Verlag., 237-242 pp.
- Dugdale, C., Chow, B., Yakirevich, E., Kojic, E., Knoll, B.**, 2014, Prolonged Pyrexia and Hepatitis: Q fever. *Am. J. Med.* 127:928 –930 pp.
- Dupont, T. H., Raoult, D., Brouqui, P., Janbon, F., Peyramond, D.**, 1992, Epidemiologic Features and Clinical Presentation of Acute Q fever in Hospitalized Patients, *J. Med.* 93: 427–434 pp.
- Dupont, T. H., Raoult, D., Torres, S., Nezri, M.**, 1999, Hyperendemic Focus of Q Fever Related to Sheep and Wind, *American Journal of Epidemiology*, 150:67–74 pp.
- Dupont, T. H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D.**, 2004, Wind in November, Q Fever in December *Emerging Infectious*, Vol. 10, No. 7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duron, O., Noël, V., Karen D. McCoy, K.D.,** 2015a, The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*, *PLoS Pathog*, 11(5).
- Duron, O.,** 2015b, The *IS1111* insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 362, No. 17.
- Eldin, C., Angelakis, E., Renvoisé, A, Raoult, D.,** 2013, *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 88:765–769 pp.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M.,** 2017, From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change, *Clin. Microbiol.*, 30:115–190 pp.
- Epelboin, L., Chesnais, C., Boullé, C., Drogoul, A.S, Raoult, D.,** 2012, Q fever pneumonia in French Guiana: Prevalence, Risk Factors, and Prognostic Score, *Clin. Infect. Dis.*, 55:67–74 pp.
- Fenollar, F., Raoult, D.,** 2004, Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms, *APMIS*, 112(11–12): 785–807 pp.
- Fournier, P., Marrie, T.J., Raoult, D.,** 1998, Diagnosis of Q fever, *J. Clin.Microbiol.*, USA., 36(7): 1823–1834 pp.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A.,** 2006, DNA Repair and Mutagenesis, American Society of Microbiology Press, Washington, D.C.
- Gikas, A., Kokkini, S., Tsioutis, C.,** 2010, Q fever: Clinical Manifestations and Treatment, *Expert Rev., Anti Infect. Ther.*, 8(5), 529–539 pp.
- Gilk, S.D.,** 2012, Role of Lipids in *Coxiella burnetii* Infection, Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science+Business Media, Dordrech, Ch:10, 984:199-213 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fourous, G., 2005,** *Coxiella burnetii* genotyping, *Emerg Infect Dis.*; 1: 1211–1217 pp.
- Greiner, T. C., Mitros, F. A. , Sapleton, J., Van Rybroek, J., 1992.** Fine needle aspiration findings of the liver in a case of Q fever., *Diagn. Cytopathol.*, 8:181–184 pp.
- Guatteo, R., Beaudeau, 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 pp.
- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.F., Joly, A., Beaudeau, F., 2011,** Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review, *Veterinary Microbiology*, 149, 1–16 pp.
- Gülay, A., Zişan, E., Canpolat, S., Düzgün, A., Vatansever, Y., Mert, H., 2010,** *Coxiella burnetii*'nin kenelerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR-RFLP ile saptanması, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Teknik Rapor, 2010/3.
- Gülmez, A., 2013,** Sığır ve Koyun ve Keçi sürülerinden alınan örneklerde *Coxiella burnetii* Varlığının Araştırılması, Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 109s.
- Günaydın, E., Müştak, H.K., 2003,** Q Humması, *Etlik Vet. Mikrobiyol Derg.*, (24) 26-32 s.
- Günaydın, E., Müştak, H.K., Sareyyüpoğlu, B. Ata, Z., 2015,** Ruminantların Fötal Abomasal İçeriklerinde *Coxiella burnetii*'nin PCR ile Tespiti, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 21 (1): 69-73 pp.
- Gürbilek, S.E., Keskin, O., Yiğın, A., Yaşar, O., 2018,** Ruminant Abortus Vakalarında *Coxiella burnetii*'nin Real-Time PCR ile Araştırılması, *Dergipark, Harran Veteriner Fakültesi*, cilt:7, sayı :1, 79-83 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hazlett, M.J., McDowall, R., DeLay, J., Stalker, M., McEwen, B.,** 2013, A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* infection concurrently with other major pathogens, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(3) 359 –368 pp.
- Heidari, S., Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Ansari, M., Masoudian, M., Eraghi, V.,** 2018, Molecular detection of *Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetii*, and *Mycoplasma agalactiae* in small ruminant's aborted fetuses in southern Iran, *Tropical Animal Health and Production*, (50), 779–785 pp.
- Heinzen, R. A. and Hackstadt, T.,** 1996, A Developmental Stage-specific Histone H1 Homolog of *Coxiella burnetii*, *J. Bacteriol.*, USA., 178:5049–5052 pp.
- Hendrix, L. R., J. E. Samuel, Mallavia, L. P.,** 1991, Differentiation of *Coxiella burnetii* Isolates by Analysis of Restriction-endonuclease-digested DNA Separated by SDS-PAGE. *J. Gen. Microbiol.*, England, 137:269–276 pp.
- Herndon, G. and Rogers, J.H.,** 2013, Multiple “doughnut” granulomas in *Coxiella burnetii* infection (Q fever), *American Society Hematology*, (122), 3099 p.
- Honstettre, A., Ghigo, E., Moynault, A., Capo, C., Toman, R.,** 2004, Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is Involved in Bacterial Phagocytosis, Filamentous Actin Reorganization and Inflammatory Responses Through Toll-like receptor 4, *J. Immunol.*, 172, 3695–3703 pp.
- Hoover, T.A., Vodkin, M.H., Williams, J.C.,** 1992, A *Coxiella burnetii* Repeated DNA Element Resembling a Bacterial Insertion Sequence, *J Bacteriol*, 174, 5540-5548 pp.
- Hornstra, H.M., Priestley, R.A., Georgia, S.M., Kachur, S., Birdsell, D.N., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Samuel, J.E.,** 2011, Rapid typing of *Coxiella burnetii*, *PLoS One* , 6:e26201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jäger C., H., Willems, D. Baljer, G.,** 1998, Molecular Characterization of *Coxiella burnetii* Isolates, *Epidemiol. Infect.*, 120(2): 157–164 pp.
- Jones, R. M., Twomey, D. F., Hannon, S., Errington, Sawyer J., Pritchard, G. C.,** 2010, Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion samples from British ruminants using real-time PCR, *Veterinary Record.*, 167, 965-967 pp.
- Khaled, H., Sidi-Boumedine, K., Merdja, S., Dufour, P., Dahmani, A., Thiery, R., Rousset, E., Bouyoucef, A.,** 2016, Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria, *C.M.I.D.*, 47, 19-25 pp.
- Kılıç, A.,** 2017, Koyun ve Keçi Sütlerinde *Coxiella burnetii* Varlığının PCR ile Araştırılması, *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 12(2): 152-156 s.
- Kılıç, A., Kalender, H., Koç, O., Kılınç, Ü., Berri, M.,** 2015, Molecular investigation of *Coxiella burnetii* infections in aborted sheep in eastern Turkey, *IJVR*, Vol. 17, No. 1, Ser. No. 54, 41-44 pp.
- Kılıç, S. ve Çelebi, B.,** 2008, Q Fever, *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, Ankara, 65 (3) Ek 3.
- Kırkan, Ş., Kaya, O., Tekbıyık, S., Parın, U.,** 2008, Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by using PCR, *Turk. J. Vet. Anim Sci.*, 32:215-220 pp.
- Klee, S.R., Tyczka, J., Ellebrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G.,** 2006, Highly Sensitive Real-time PCR for Specific Detection and Quantification of *Coxiella burnetii*, *BMC Microbiol.*, 6: 1–8 pp.
- Kohler, L. J. and Craig, R. R.,** 2015, Biogenesis of the Lysosome-derived Vacuole Containing *Coxiella burnetii*, *Microbes Infect.*, 17(0): 766–771 pp.
- Kreizinger, Z., Szeredi, L., Bacsadi, Á. Nemes, C., Sugár, L., Varga, T., Sulyok, K.M., Szigeti, A., Ács, K., Tóbiás, E., Borel, N., Gyuranecz, M.,** 2015, Occurrence of *Coxiella burnetii* and *Chlamydiales* species in abortions of domestic ruminants and in wild ruminants in Hungary, Central Europe, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 27(2) 206–210 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Küçükkalem, Ö. F., Cengiz, S., Kılıç, S., Yıldırım, M.,** 2013, Erzurum İlinde sığır abortlarında *Coxiella burnetii*'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi, *Atatürk Üniv. Vet. Bil. Derg.*, 8 (3):224-228 s.
- Landais, C., Fenollar, F., Thuny, F., Raoult, D.,** 2007, From Acute Q fever to Endocarditis: serological follow-up strategy, *Clin. Infect. Dis.*,44(10), 1337–1340 pp.
- Larson, C.L., Martinez, E., Beare, P.A., Jeffrey, B., Heinzen, R.A., Bonazzi, M.,** 2016, Right on Q: Genetics Begin to Unravel *Coxiella burnetii* Host Cell Interactions, *Future Microbiol.*,11, 919–939 pp.
- Leloğlu, N.,** 1977, Erzurum, Kars ve Ağrı illerinde Q humması üzerine çalışmalar, *Atatürk Üni. Ziraat Fak Derg.*,8:113-31 s.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M.,** 2003, Q fever: A Biological Weapon in Your Backyard, *Lancet Infect. Dis.*, 3: 709–721, pp.
- Magouras, I., Hunninghaus, J., Scherrer, S., Wittenbrink, M. M., Hamburge, A., Stark K.D.C., Schupbach-Regula, G.,** 2014, *Coxiella burnetii* Infections in Small Ruminants and Humans in Switzerland, *Transboundary and Emerging Diseases*, vol:64, 204-212 pp.
- Malou, N., Renvoise, A., Nappez, C., Raoult, D.,** 2012, Immuno-PCR for the early serological diagnosis of acute infectious diseases: the Q fever paradigm, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31:1951–1960 pp.
- Mares-Guia, M.A.M., Guterres, A., Rozental,T., Santos Ferreira, M., Lemos, E.R.S.,** 2017, Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element *IS1111* associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*, *BJM*, 286 p.
- Marrie, T.J. ,** 2010, Q fever pneumonia, *Infect.Dis. Clin. North. Am.*, 24:27– 41 pp.
- Masala,G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, G., Patta, C., Tola, S.,** 2007, Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19:96–98 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maurin, M., Raoult, D.**, 1999, Q fever, *Clin.Microbio.Rev.*, 12: 518–553 pp.
- McCaul, T. F.**, 1991, The Development Cycle of *Coxiella burnetii*, Q fever: the biology of *Coxiella burnetii*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 223–258 pp.
- McCaul, T.F., Williams, J.C.**, 1981, Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: Structure and Morphogenesis of Vegetative and Sporogenic Differentiations, *J. Bacteriol*; 147: 1063–1076 pp.
- Meconi, S., Capo, C., Remacle-Bonnet, M.**, 2001, Activation of Protein Tyrosine Kinases by *Coxiella burnetii*: Role in Actin Cytoskeleton Reorganization and Bacterial Phagocytosis, *Infect. Immun*, 69: 2520–2526 pp.
- Meghari, S., Bechah, Y., Capo, C.**, 2008, Persistent *Coxiella burnetii* infection in mice over expressing IL-10: an efficient model for chronic Q fever pathogenesis, *PLoS Pathog*, 4:e23
- Mertens, K., Samuel, J.K.R., Toman, R.**, 2012, Defense Mechanisms Against Oxidative Stress in *Coxiella burnetii* : Adaptation to a Unique Intracellular Niche, Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium, *Advances in Experimental Medicine*, Ch: 3, 39-59 pp.
- Miller, J.D., Thompson, H.A.**, 2002, Permeability of *Coxiella burnetii* to Ribonucleosides, *Microbiology*; 148: 2393–2403 pp.
- Minnick, F.M., Raghavan, R., Toman, R.**, 2012, Recent Advances and New Perspectives 231 in Research of the Q Fever Bacterium, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science+Business Media, Dordrecht, Ch: 12, 231-246 pp.
- Mori, M. And Roest, H.J.**, 2018, Farming, Q fever and public health: agricultural practices and beyond, *Archives of Public Health*, 76:2 p.
- 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 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Navarro, J. A., Ortega, N. Buendia, A. J., Gallego, M. C., Martínez, C. M., Caro, M. R. Sánchez, J., Salinas, J.,** 2009, Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples, *Veterinary Record* , 165, 175-178 pp.
- Newton, H.J., McDonough, J.A., Roy, C.R.,** 2013, Effector Protein Translocation by the *Coxiella burnetii* Dot/Icm type IV Secretion System Requires Endocytic Maturation of the Pathogen-occupied Vacuole, *PLoS One* 8, e54566.
- Nguyen, S.V. and Hirai, K.,** 1999, Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene, *FEMS Microbiol Lett*, 180:249-254 pp.
- Oh, M., Baek, S., Lee, S.O., Yu, E., Ryu, J.S.,** 2012, A Case of Acute Q fever Hepatitis Diagnosed by F-18 FDG PET/CT, *Nucl. Med. Mol. Imaging*, 46: 125–128 pp.
- Oliveira, J.M.B., Rozental,T., Lemos, E.R.S., Forneas, D., Ortega-Morac, L.M.,** 2018, *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil, *Acta Tropica*, 183,19–22 pp.
- Omsland, A., Cockrell, D.C., Fischer, E.R., Heinzen, R.A.,** 2008, Sustained Axenic Metabolic Activity by the Obligate Intracellular Bacterium *Coxiella burnetii*, *J. Bacteriol.*, 190:3203–3212 pp.
- Oyston, P. C. F. And Davies, C.,** 2011, Q fever: the Neglected Biothreat Agent, *Journal of Medical Microbiology* , 60, 9–21 pp.
- Öngör, H., Cetinkaya, B., Karahan, M., Açık, M.N., Bulut, H., Muz, A.,** 2004, Detection of *Coxiella burnetii* by Immunomagnetic Separation-PCR in the Milk of Sheep in Turkey, *Vet Rec* ,18:570-572 pp.
- Özbey, G., Kalender, H., Muz, A.,** 2009, Q Humması'nın Epidemiyolojisi ve Teşhisi, *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 18(2), 100-110 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özkaraca, M., Çeribaşı, S., Çeribaşı, A.O., Kılıç, A., Altun, S., Çomaklı, S., Öngör, H.**, 2016, Determination of *Coxiella burnetii* in bovine foetuses using PCR and immunohistochemistry, *Vet Med*, 61, 421-427 pp.
- Paiba, G.A., Loyd, G., Bewley, K., Webster, G.J., Green, L.E., Morgan, K.L.**, 1999, An Investigation of *Coxiella burnetii* Infection at Calving within a Herd of Dairy Cows in England Using PCR, *Elsevier*; 387–392 pp.
- Payzın, S.**, 1953, Epidemiological Investigations on Q fever in Turkey, *Bull. World. Hlth. Org.*, 9:553-8 p.
- Parın, U.**, 2011, Sığır, Koyun ve Keçi sürülerinde *Coxiella burnetii* Yayılımının Saptanması, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 77s.
- Parisi, A., Fraccalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I.**, 2006, Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR, *Veterinary Microbiology*, 118, 101–106 pp.
- Park, S.H., Lee, H.W., Cao, W.**, 2010, Screening of Nitrosative Stress Resistance Genes in *Coxiella burnetii*: Involvement of Nucleotide Excision Repair, *Microb. Pathog.*, 49:323–329 pp.
- Pearson, T., Cocking, J.H., Hornstra, H.M., Keim, P.**, 2016, False detection of *Coxiella burnetii*—what is the risk? , *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 363, No.10
- Pechstein, J., Luehrmann, J.S., Lührmann, A.**, 2018, *Coxiella burnetii* as a Useful Tool to Investigate Bacteria-friendly Host Cell Compartments, *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 308, 77-83 pp.
- Pexara, A., Solomakos, N., Govaris, A.**, 2018, Q fever and Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Domestic Ruminants, *Veterinaria Italiana*, 54(4), 265-279 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raoult, D., Fenollar, F., Stein, A.,** 2002, Q fever During Pregnancy, Diagnosis, Treatment, and Follow-up, *Arch. Intern. Med.*, 162: 701-704 pp.
- Raoult, D., Marrie, T., Mege, J.,** 2005, Natural History and Pathophysiology of Q fever, *Lancet Infect. Dis.*, 5:219 –226 pp.
- Rioseco, M.M., Correa, F.R., Miller, M.M., Sondgeroth, K., Fraga, M., Silveira, C., Uzal, A.F.,** 2019, Bovine abortion caused by *Coxiella burnetii*: report of a cluster of cases in Uruguay and review of the literature, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 31(4) 634–639 pp.
- Rodolakis, A.,** 2006, Chlamydiosis and Q fever, similarity and difference between these two zoonoses, *Renc. Rech. Ruminants*, 13, 395–402 pp.
- Rodolakis, A., Berri, M., Héchard, C., Caudron, C., Souriau, A.,** 2007, Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds, *J. Dairy. Sci.*, 90, 5352-5360 pp.
- Roest, I.J., Bossers, A., Fred, G., Van Zijderveld, F.G., Rebel, M.L.,** 2013, Clinical Microbiology of *Coxiella burnetii* and Relevant Aspects for the Diagnosis and Control of the Zoonotic Disease Q fever, *Veterinary Quarterly*, 148-160 pp.
- Roman, M. J., Coriz, P. D., Baca, O. G.,** 1986, A Proposed Model to Explain Persistent Infection of Host Cells with *Coxiella burnetii*, *J. Gen. Microbiol.*, 132:1415–1422 pp.
- Rousset, E., Durand, B., Berri, M.,** 2007, Comparative Diagnostic Potential of Three Serological Tests for Abortive Q Fever in Goat Herds, *Vet. Microbiol.*, 124, 286-297 pp.
- Sandoz, K.M., Popham, D.L., Beare, P.A., Sturdevant, D.E., Hansen, B., Nair, V., Heinzen, R.A.,** 2016, Transcriptional profiling of *Coxiella burnetii* reveals extensive cell wall remodeling in the small cell variant developmental form, *PLoS One*, 11:e0149957.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schaik, E.J, Chen, C., Mertens, K., Samuel, E.J.,** 2013, Molecular Pathogenesis of the Obligate Intracellular Bacterium *Coxiella burnetii*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 11(8): 561–573 pp.
- Schnydrig, P., Vidal, S., Brodard, I., Frey, C.F., Posthaus, H., Perreten, V., Rodriguez-Campos, S.,** 2017, Bacterial, fungal, parasitological and pathological analyses of abortions in small ruminants from 2012-2016, *Band 159, Heft* , 647–656 pp.
- Schoffelen, T., Joosten, L.A.B., Herremans, T., de Haan A.F.J., Ammerdorffer, A., Rümke, H.C.,** 2013, Specific interferon detection for the diagnosis of previous Q fever. *Clin Infect Dis*, 56:1742–1751 pp.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A.,** 2003, Complete Genome Sequence of the Q-fever Pathogen *Coxiella burnetii*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*,100: 5455–5460 pp.
- Stein, A. and Raoult. D.,** 1993, Lack of Pathotype Specific Gene in Human *Coxiella burnetii* Isolates, *Microb. Pathog.*, 15:177–185 pp.
- Stein, A., Raoult, D.,** 1995, Q fever endocarditis, *Eur. Heart J.*, 16 (suppl B): 19–23 pp.
- Stein, A., Saunders, N.A., Taylor, A.G., Raoult, D.,** 1993, Phylogenic Homogeneity of *Coxiella burnetii* Strains as Determined by 16S Ribosomal RNA Sequencing, *FEMS Microbiol. Lett.*, 113:339–344 pp.
- Sting, R., Molz, K., Philipp, W., Bothe, F., Runge, M., Ganter, M.,** 2013, Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats, *Veterinary Microbiology*, 167, 600–608 pp.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L.,** 2006, Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*, *FEMS Microbiol Lett*, 254:268–274 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tan, C., K., Owens, L., 2000,** Infectivity, transmission and 16s rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*, *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol.41, 115-122 pp.
- Tobin, M. J., Cahill, N., Gearty, G., Maurer, B., Blake, S., Daly, K., Hone, R., 1982,** Q fever endocarditis, *Am. J. Med.*, 72:396–400 pp.
- Vaidya, M.V., Malik, S.V.S, Bhilegaonkar, K.N., Rathor, R.S., Kaur, S. Barbuddhe, S.B., 2010,** Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders, *Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, (33), 307–321 pp.
- Van den Brom, R., Van Engelen, E., Roest, H.I.J., Van der Hoek, W., Vellemaa P., 2015,** *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review, *Veterinary Microbiology*, S0378-1135(15) 273-274 pp.
- Vanderburg, S., Rubach, M.P., Halliday, J.E.B., Cleaveland, S., Reddy, 2014,** Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa, One Health systematic review, *PLoS Negl Trop Dis.*, 8:e2787.
- Voth, D.E., Heinzen, R.A., 2007,** Lounging in a Lysosome: The Intracellular Lifestyle of *Coxiella burnetii*, *Cell. Microbiol.*, 9(4): 829–840 pp.
- Voth, D.E. and Heinzen, R.A., 2009,** Sustained Activation of Akt and Erk1/2 is Required for *Coxiella burnetii* Antiapoptotic Activity, *Infect. Immun.*, 77: 205–213 pp.
- Waag, M.D., 2007,** *Coxiella burnetii*: Host and bacterial responses to infection, *Vaccine* 25, USA., 7288–7295 pp.
- Wallqvist, A., Wang, H., Zavaljevski, N., Vesna Memisević, V., Kwon, 2017,** Mechanisms of Action of *Coxiella burnetii* Effectors Inferred from Host-pathogen Protein Interactions, *PLoS ONE*, USA., 12(11): e0188071.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, G., Alamuri, P., Humayun, M.Z., Taylor, D.E., Maier, R.J.,** 2005, The *Helicobacter pylori* MutS Protein Confers Protection from Oxidative DNA Damage. *Mol. Microbiol.*, 58:166–176 pp.
- Wegdam-Blans, M.C.A., Vainas, T., Sambeek, M.R., Cuypers, P.W.,** 2011, Vascular complications of Q-fever infections. *Eur. J. Vas. Endovasc. Surg.*, 42:384–392 pp.
- Weiss, E. and Moulder, J.W.,** 1984, Genus III. *Coxiella*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore, vol.1, 701-704 pp.
- Whittick, J. W.,** 1950, Necropsy Findings in a Case of Q Fever in Britain, *Br. Med. J.*, 1:979–982 pp.
- Willems, H., Thiele, D., Krauss, H.,** 1993, Plasmid Differentiation and Detection of *Coxiella burnetii* in Clinical Samples, *Eur. J. Epidemiol.*, 9: 411–418 pp.
- Woldehiwet, Z.,** 2004, Q Fever (Coxiellosis) Epidemiology and Pathogenesis. *Research in Veterinary Science*, 93–100 pp.
- Zamboni, D.S., Campos, M.A., Torrecilhas, A.C.,** 2004, Stimulation of Toll-like Receptor 2 by *Coxiella burnetii* is Required for Macrophage Production of Pro-inflammatory Cytokines and Resistance to Infection, *J. Biol. Chem*, 279:54405–54415 p.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca verdiği destek, olumlu ve güleryüzlü tavrı için değerli danışman hocam Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR'e, gelişimime katkı sunan tüm Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, akademik gelişimi her daim destekleyen Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Dr.Özhan TÜRKYILMAZ'a, Uzm.Biyolog Bahtiyar YILMAZ'a, örneklerin organizasyonunda yardımını gördüğüm laborant Murat GÜLTEKİN'e, doktora eğitim sürecimde desteğini esirgemeyen eşim Barış YÜKSEL'e ve beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

21/05/2020

Eylem Şen Yüksel



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Eylem Şen Yüksel	
Doğum Yeri ve tarihi	İstanbul/13.06.1979	
Lisans Eğitimi	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı	
Doktora	Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	
Yabancı Dil	İngilizce	
Görevi	Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Laboratuvarı/ Veteriner Hekim	
Tel	0 232 388 00 10	
Elektronik posta	eylem.senyuksel@tarim.gov.tr seneylemsen@hotmail.com	
İş Deneyimi	2004-2009 Özel Sektör Tecrübesi 2009- Tire İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü 2010-Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü 2010-2012 Gıda Kontrol Laboratuvarı 2012-2019 Bakteriyoloji Laboratuvarı Halen, Veteriner Biyolojik Ürünler Kontrol Laboratuvarı	
Aldığı Eğitimler		
Eğitim Konusu	Eğitimi Veren Kurum	Eğitim Tarihi
ISO 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarı için Yeterlilik Şartları	Elginkan Vakfı	2010
Mikrobiyolojide Besi Yeri Hazırlığı ve Genel kuralları	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü	2011
Vitek 2 Aplikasyon Eğitimi	Biomerieux	2012
Brucella Rose-Bengal Testinin Uygulanması ve Değerlendirilmesi	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü	2012
Brucella türlerinde İzolasyon ve İdentifikasyon	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü	2014
ISO/IEC 17043 Uygunluk Değerlendirmesi-Yeterlilik deneyleri için genel gerekler	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü	2015
Mycoplasma Enfeksiyonlarında İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü- Mycoplasma laboratuvarı	2017
İç Kalite Denetçisi Eğitimi	Elginkan Vakfı	2017
Antraks Hastalığında Teşhis	Etlik Veteriner Araştırma ve Kontrol Enstitüsü/ Bakteriyoloji laboratuvarı	2018
Biyogüvenlik ve Biyorisk	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü	2018

Araştırma Etiği	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü	2019
Proje Çeşitleri ve Hazırlama Teknikleri	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü	2019
Deney Hayvanları Kullanım Sertifika Programı	Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü	2019
Sunu ve Sunum Teknikleri	Uluslararası Tarımsal Eğitim Merkezi	2019
Yer Aldığı veya Yürüttüğü Projeler		
Ege Bölgesinde Ruminant Abortuslarında <i>Coxiella burnetii</i> ve <i>Chlamydophila abortus</i> Sıklığının / Yürütücü, tamamlandı Araştırılması		
TAGEM , Ülkesel Antibiyotik Direnç Projesi / Yardımcı araştırmacı		
TAGEM , Ülkesel Brucella Projesi / Yardımcı araştırmacı		
TAGEM-Özel Sektör İşbirliği , Koyun ve keçilerin Kazeöz Lenfadenitis (Pseudotuberculosis) / Yardımcı Araştırmacı enfeksiyonlarına karşı kombine aşı hazırlanması		