

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MİKROBİYOLOJİ (VETERİNER)**  
**DOKTORA PROGRAMI**

**MARMARA BÖLGESİ RUMİNANT ABORTLARINDA**  
***Coxiella burnetii*'nin REAL-TİME PCR İLE TEŞHİSİ VE MLVA**  
**İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**ORBAY SAYI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Serap SAVAŞAN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-19009 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2022**

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda öncelikle hoşgörüsünü, desteğini ve ilgisini esirgemeyen sevgili danışmanım Prof. Dr. Serap SAVAŞAN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın diğer öğretim üyelerine, tez çalışmamı bitirmemde her nazımı çeken, hiçbir isteğimi geri çevirmeyen dostum Dr. Ediz Kağan ÖZGEN'e, çalışmalarımda bana yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İrem GÜL'e, Gürkan ŞİMŞEK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır ve özveri için eşim Ceren SAYI'ya ve duaları ve hayat boyu bana verdikleri destekleri için annem Vesile SAYI, babam Yalçın SAYI'ya ayrıca teşekkür eder minnetlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY .....                                                   | i    |
| TEŞEKKÜR .....                                                        | ii   |
| İÇİNDEKİLER .....                                                     | iii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                  | v    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                 | vi   |
| RESİMLER DİZİNİ .....                                                 | vii  |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                 | viii |
| ÖZET .....                                                            | ix   |
| ABSTRACT .....                                                        | x    |
| 1.GİRİŞ .....                                                         | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                               | 3    |
| 2.1. Tarihçe .....                                                    | 3    |
| 2.2. Bakteri Özellikleri .....                                        | 5    |
| 2.3. Epidemiyoloji .....                                              | 6    |
| 2.4. <i>Coxiella burnetii</i> 'nin Türkiye'de Güncel Prevelansı ..... | 9    |
| 2.5. Bakterini Yaşam Döngüsü .....                                    | 12   |
| 2.5.1. Küçük ve Büyük Hücre Varyantları .....                         | 12   |
| 2.6. <i>C. burnetii</i> İzolatlarının Çeşitleri .....                 | 15   |
| 2.7. <i>C. burnetii</i> 'nin Genotipleri .....                        | 17   |
| 2.8. Q Humması Hastalığı .....                                        | 19   |
| 2.8.1. Klinik ve Laboratuvar Tanısı .....                             | 21   |
| 2.8.2. Teşhis .....                                                   | 23   |
| 2.8.2.1. Post mortem Muayene .....                                    | 23   |
| 2.8.2.2. Serolojik Muayene .....                                      | 23   |
| 2.8.2.3. PCR .....                                                    | 24   |
| 2.8.2.4. Kültür ve Tiplendirme .....                                  | 25   |
| 2.8.3. Tedavi .....                                                   | 25   |

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.8.4. Korunma .....                                                                  | 26 |
| 2.8.4.1. Aşılar .....                                                                 | 28 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                               | 29 |
| 3.1. Gereç.....                                                                       | 29 |
| 3.1.1. Numunelerin Seçimi ve Hazırlanması.....                                        | 29 |
| 3.1.2. DNA Ekstraksiyonu.....                                                         | 29 |
| 3.1.3. Nested PCR Analizi.....                                                        | 30 |
| 3.1.4. Real Time PCR Analizi .....                                                    | 32 |
| 3.1.5. MLVA Analizi.....                                                              | 33 |
| 3.2. Yöntem .....                                                                     | 34 |
| 3.2.1. Numunelerin Hazırlanması.....                                                  | 34 |
| 3.2.3. Real Time PCR Analizi .....                                                    | 35 |
| 3.2.4. Nested PCR Analizi.....                                                        | 36 |
| 3.2.5. Jel Elektroforez.....                                                          | 37 |
| 3.2.6. MLVA .....                                                                     | 37 |
| 4. BULGULAR .....                                                                     | 39 |
| 4.1. İllere göre numune ve hayvan türleri.....                                        | 39 |
| 4.2. Real time PCR bulguları.....                                                     | 40 |
| 4.3. Nested PCR bulguları .....                                                       | 43 |
| 4.4. MLVA Analizi.....                                                                | 44 |
| 5. TARTIŞMA.....                                                                      | 47 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                            | 54 |
| KAYNAKLAR.....                                                                        | 56 |
| EKLER .....                                                                           | 66 |
| Ek 1. MLVA analizi sonucunda oluşturulan gen lokus gruplarının çember diyagramı. .... | 66 |
| Ek.2 Etik Kurul Onayı.....                                                            | 67 |
| BİLİMSEL ETİK BEYANI .....                                                            | 68 |
| ÖZ GEÇMİŞ.....                                                                        | 69 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|             |                                           |
|-------------|-------------------------------------------|
| <b>CFT</b>  | : Komplement fiksasyon testi              |
| <b>CT</b>   | : Cycle Threshold                         |
| <b>DNA</b>  | : Deoksiribonükleik Asit                  |
| <b>FAT</b>  | : Floresan antikor testi                  |
| <b>IgG</b>  | : İmmunglobulin G                         |
| <b>IgM</b>  | : İmmunglobulin M                         |
| <b>LCV</b>  | : Büyük Hücre Varyantı                    |
| <b>LPS</b>  | : Lipopolisakkarit                        |
| <b>MAT</b>  | : Mikroaglutinasyon Testi                 |
| <b>MLVA</b> | : Multilokus VNTR Analizi                 |
| <b>OIE</b>  | : Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü             |
| <b>PBS</b>  | : Fosfatlı Tampon Çözelti                 |
| <b>PCR</b>  | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu             |
| <b>qPCR</b> | : Kantitatif Polimerase Zincir Reaksiyonu |
| <b>SCV</b>  | : Küçük Hücre Varyantı                    |
| <b>SDC</b>  | : Küçük Yoğun Hücre                       |
| <b>TAE</b>  | : Tris Acetate EDTA buffer                |
| <b>%</b>    | : Yüzde oranı                             |
| <b>µl</b>   | : Mikrolitre                              |
| <b>µmol</b> | : Litre başına mikromol                   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                 |                                                                                          |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> | Koyun ve keçi serumlarında pozitiflik yüzdelerinin Türkiye haritasında dağılımları ..... | 10 |
| <b>Şekil 2.</b> | Sığır serumlarında pozitiflik yüzdelerinin Türkiye haritasında dağılımları ..            | 10 |
| <b>Şekil 3.</b> | Ökaryotik hücrede <i>C.burnetii</i> 'nin varsayılan gelişimsel döngüsünün modeli ...     | 15 |
| <b>Şekil 4.</b> | Q Humması'nın doğal seyri .....                                                          | 22 |
| <b>Şekil 5.</b> | Spin kolon metoduyla DNA izolasyonu.....                                                 | 35 |
| <b>Şekil 6.</b> | Numune sayılarının hayvan türlerine göre dağılımı .....                                  | 40 |
| <b>Şekil 7.</b> | Real Time analiz sonuçlarına ait grafik.....                                             | 42 |

## RESİMLER DİZİNİ

|                 |                                                                                      |    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Resim 1.</b> | Coxiella burnetii bulaş döngüsü.....                                                 | 7  |
| <b>Resim 2.</b> | Nested PCR Trans 1 ve Trans 2 analiz sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü..... | 44 |
| <b>Resim 3.</b> | 16 adet numuneye ait MVLA analiz sonucunda oluşan gruplar.....                       | 46 |



## TABLÖLAR DİZİNİ

|                  |                                                                                            |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b>  | Bölgelere Göre Toplu Koyun /Keçi Serum Sonuçları .....                                     | 9  |
| <b>Tablo 2.</b>  | <i>C. burnetii</i> izolatlarının seçilmiş sekansı hakkında genotipik ve fenotipik bilgiler | 17 |
| <b>Tablo 3.</b>  | <i>C. burnetii</i> için yayınlanmış genotipleme teknikleri ve ilk yayınlandığı yıl.        | 19 |
| <b>Tablo 4.</b>  | DNA izolasyonu için kullanılan nükleik asit izolasyon kit içeriği.....                     | 30 |
| <b>Tablo 5.</b>  | Kullanılan cihazlar ve kimyasallar .....                                                   | 30 |
| <b>Tablo 6.</b>  | Kullanılan Primer dizileri.....                                                            | 31 |
| <b>Tablo 7.</b>  | Real Time PCR’da kullanılan primer ve mastermix setleri, cihazlar .....                    | 32 |
| <b>Tablo 8.</b>  | Real Time PCR’da kullanılan primer dizileri.....                                           | 32 |
| <b>Tablo 9.</b>  | MLVA analizinde kullanılan materyal ve cihazlar.....                                       | 33 |
| <b>Tablo 10.</b> | Örneklerin kromozomal DNA’larında belirlenen tekrar eden lokuslar.....                     | 34 |
| <b>Tablo 11.</b> | <i>C. burnetii</i> analizi için alınan numunelerin illere göre dağılımları.....            | 39 |
| <b>Tablo 12.</b> | Hayvan türlerine göre pozitif ve negatif kayıtların yüzde dağılımı.....                    | 40 |
| <b>Tablo 13.</b> | İllere türlerine göre pozitif ve negatif kayıtların yüzde dağılımı.....                    | 41 |
| <b>Tablo 14.</b> | Numunelerin CT değerleri ve NanoDrop test sonuçları.....                                   | 41 |
| <b>Tablo 15.</b> | İllere ve türlere göre numune ve pozitiflik sayıları.....                                  | 43 |
| <b>Tablo 16.</b> | 16 adet pozitif örnekte MLVA profillerine ait genel veriler.....                           | 45 |

## ÖZET

### MARMARA BÖLGESİ RUMİNANT ABORTLARINDA *COXIELLA BURNETII*'NİN REAL-TİME PCR İLE TEŞHİSİ VE MLVA İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Sayı, O. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2022.

**Amaç:** Marmara Bölgesindeki ruminant türlerinde *C.burnetii* varlığının daha iyi değerlendirilmesi ve elde edilen MLVA profillerinin inaktif veri tabanları ile karşılaştırılması, elde edilen verilerle enfeksiyonlardan sorumlu suşların genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Tez çalışmasında, 2017-2019 yılları toplanan 32 sığır, 4 manda, 64 koyun, 8 keçi olmak üzere toplam 108 adet evcil ruminantlara ait aborte fetüs ve plasental örnekleri materyali oluşturmaktadır. Numunelerin analizlerinde DNA ekstraksiyonu, Real Time PCR, Nested PCR ve MLVA yöntemleri kullanılmıştır.

**Bulgular:** Sunulan tez çalışmasında toplam 108 adet aborte fetüs ve plasenta örneği analiz edilmiştir. Numunelerin alındığı hayvan türleri incelendiğinde koyun örnekleri tüm incelenen numunelerinin %59,2 (64/108)'sini oluşturmuştur. Real Time PCR ile DNA'sı tespit edilen türler; koyun numunelerinde %20,3 (13/64), sığır numunelerinde %9,4 (3/32), keçi numunelerinde %25 (2/8) oranında olduğu belirlenmiştir. Manda numunelerinden herhangi bir pozitiflik tespit edilmemiştir. MLVA analizleri sonrasında tespit edilen *C.burnetii* suşlarının Dünya literatürleriyle karşılaştırılması sonrası yakınlık durumları kayıt edilmiştir.

**Sonuç:** Marmara Bölgesinde yer alan 12 ilden toplanan 108 adet evcil ruminantlara ait aborte fetüs ve plasenta örneklerinde *C.burnetii* varlığının tespiti ve MLVA yöntemiyle pozitif DNA'ya sahip numunelerin diğer *Coxiella burnetii* suşlarıyla olan ilişkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında; hem Real Time hem de Nested PCR yöntemleriyle 18'er adet paralel *C.burnetii* DNA'sı saptanmıştır. 16 pozitifliğin MLVA yöntemiyle çalışılması sonucunda yakın ilişkisi bulunan suşlar kayıt edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Coxiella burnetii*, MLVA, Nested PCR, Real Time PCR, Ruminant

## ABSTRACT

### DIAGNOSIS OF *COXIELLA BURNETII* IN RUMINANT ABORTIES IN MARMARA REGION WITH REAL-TIME PCR AND MOLECULAR CHARACTERIZATION WITH MLVA

Sayı O. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Program (Veterinary), Doctorate (PhD) Thesis, Aydın, 2022.

**Objective:** It was aimed to better evaluate the presence of *C.burnetii* in ruminant species in the Marmara Region, to compare the obtained MLVA profiles with inactive databases, and to genotype the strains responsible for infections with the data obtained.

**Material and Methods:** In the thesis study, aborted fetus and placental samples of a total of 108 domestic ruminants, including 32 cattle, 4 buffaloes, 64 sheep, 8 goats, collected between 2017-2019, constitute the material. DNA extraction, Real Time PCR, Nested PCR and MLVA methods were used in the analysis of the samples.

**Results:** In the presented thesis, a total of 108 aborted fetus and placenta samples were analyzed. Species whose DNA was detected by Real Time PCR; It was determined that it was 20.3% (13/64) in sheep samples, 9.4% (3/32) in cattle samples, 25% (2/8) in goat samples. No positivity was detected from the buffalo samples. After the comparison of the *C.burnetii* strains detected after MLVA analyzes with the xumma xummasinin, their proximity status was recorded.

**Conclusion:** In this thesis study, the determination of the presence of *C.burnetii* in aborted xumma and placenta samples of 108 domestic ruminants collected from 12 provinces in the Marmara Region and the relationships of samples with positive DNA with other *Coxiella burnetii* strains by MLVA method; 18 parallel *C.burnetii* DNAs were detected by both Real Time and Nested PCR methods. As a result of studying 16 positivity with MLVA method, strains with close relationship were recorded.

**Keywords:** *Coxiella burnetii*, MLVA, Nested PCR, Real Time PCR, Ruminant

# 1. GİRİŞ

Q humması hastalığına neden olan *Coxiella burnetii*, dünya çapında çiftlik hayvanları arasında yaygın olan, oldukça bulaşıcı bir etkidir. Bu organizma, insanların yanı sıra birçok hayvan türünü de enfekte etmektedir. Evcil ruminantlar, *C. burnetii*'nin birincil hayvan rezervuarıdır, ancak enfeksiyonlar kemirgenlerde, kuşlarda ve eklem bacaklılarda da özellikle kenelerde bulunur (Babudieri, 1959). Ruminantlara ek olarak, kediler ve köpekler de organizmayı yayabilir ve insanları enfekte edebilir (Marrie ve diğerleri, 1988). Enfekte koyun ve keçilerde ana semptom, gebeliğin son dönemlerinde şekillenen abortlardır. Enfekte hayvanlar, organizmayı dışkı, süt ve çoğunlukla plasenta zarları ve doğum sıvılarıyla saçabilirler (Maurin ve Raoult, 1999; Arricau-Bouvery ve diğerleri, 2003). Plasental membranlar, 1 gr doku başına  $10^9$  enfektif dozda *C. burnetii* içerebilir (Babudieri, 1959). Doğum sırasında, enfekte küçük ruminantların doğum materyallerinde milyarlarca bakteri salgılanır; sonrasında, kuruduktan sonra bakteriler kolayca aerosol haline gelebilir ve inhalasyon yoluyla insanları ve hayvanları enfekte edebilir (Maurin ve Raoult, 1999).

Q humması ilk olarak 1933'te Avustralya'nın Brisbane kentinde mezbaha işçilerinde ateşli bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Derrick, 1937). Sonrasında Maurin ve Raoult tarafından *Rickettsia burneti* olarak adlandırılmıştır (Maurin ve Raoult, 1999), öncesinde *C. burneti* olarak yeniden adlandırılrsa da son olarak günümüzde de geçerli olan adıyla *C. burnetii* olarak kalmıştır (Philip, 1948). *C. burnetii*'nin varlığı Yeni Zelanda hariç tüm dünyada tanımlanmıştır. Günümüzde Q humması, birçok ülkede ortaya çıkan endemik, genellikle mesleki bir hastalıktır, ancak aynı zamanda çok sayıda meslek dışı; hayvanlarla, mezbahanelerle ya da laboratuvarlarla ilişkili kişiyi etkileyen kırsal salgınlarla birlikte kendini göstermiştir (Vellema ve Van den Brom, 2014).

*C. burnetii*, insanları ve çeşitli hayvan türlerini etkileyebilir. Hastalık etkeni, oldukça ozmotik dirençli, gram negatif ve zorunlu hücre içi bir bakteridir. *Coxiella* cinsi, gen dizi analizine dayalı olarak, Legionellales, Coxiellaceae familyası, Rickettsiella ve Aquicella ile birlikte sıralanır (Seshadri ve diğerleri, 2003). *Coxiella burnetii*, virü lent faz I ve avirulent faz II'de bulunabilir. Bu fazlar arasındaki antijenik varyasyon, pürüzsüzden pürüzlü lipopolisakkarit (LPS)'ye geçişe dayanır. *C. burnetii*'nin faz I'deki pürüzsüz LPS'si, etkili bir bağışıklık tepkisini bozarak, faz I bakterisine konakta yaşama ve çoğalma fırsatı verir. Bu nedenle, faz I'de *C. burnetii* oldukça bulaşıcıdır. Daha az virulent form olan faz II,

konakçıdan hala izole edilmemiştir (Babudieri, 1959), ancak hücre kültürlerinde veya tavuk yumurtalarında kültürlendikten sonra izole edilebilir (Arricau-Bouvery ve Rodolakis, 2005).

Morfolojik olarak organizmanın üç farklı formu ayırt edilebilir: büyük hücreli varyantlar (LCV), küçük hücreli varyantlar (SCV) ve küçük yoğun hücreler (SDC). Bu formlar, morfolojik, antijenik bileşim ve fiziksel ve kimyasal direnç açısından farklılık gösterir (Heinzen ve diğerleri, 1999). Etken bir ökaryotik konak hücreye girdikten sonra, fagozomda bulunan faz I küçük hücreli varyantlar, büyük hücreli varyantlara transfer olur. Bakterinin bu büyük hücreli varyantları çoğalır ve varlığını sürdürür. Küçük hücreli varyantlar ve küçük yoğun hücreler, hücre tarafından salınır. Konaktaki kalıcı formlar olarak kabul edilirler ve organizmanın çevredeki dirençli tezahürleri olduklarına dair kanıtlar vardır (Arricau-Bouvery ve Rodolakis, 2005).

*Coxiella burnetii* için kültürde izolasyon süreci zahmetli olsa da, büyük miktarlarda bulaşıcı materyalden üretilebilir. Aerosol haline getirilmiş bir biyolojik silah olarak kullanıldığında, ajan yüksek ölüm oranına neden olmayabilir, ancak akut sakatlık hastalığına neden olabilir. Geç seyrinde, Q humması ölümcül (örn., endokardit) veya zayıflatıcı (örn., kronik yorgunluk sendromu) bozukluklarla komplike hale gelebilir. Q 2ummasının tanısı, spesifik olmayan ve değişken prezentasyonlar nedeniyle gecikebilir. Hastalığın insanlarda akut formu için etkili antibiyotik tedavisi mevcuttur, ancak kronik komplikasyonlar için değildir. Biyoterörizm durumunda seçilmiş bireylerde aşılama ve kemoprofilaksi kullanılabilir. (Madariaga ve diğerleri, 2003).

Bu çalışmanın amacı Edirne, Tekirdağ, Kırklareli, Çanakkale, İstanbul, Kocaeli, Yalova, Düzce, Balıkesir, Bilecik ve Sakarya İllerinde toplanan ruminant abort materyallerinde *Coxiella burnetii* varlığının değerlendirilmesi amacıyla prevelansının belirlenmesi ve elde edilen DNA'larda dizinlerinin MLVA analiziyle profillerinin inaktif veri tabanları ile karşılaştırılması, elde edilen verilerle enfeksiyonlardan sorumlu suşların genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

*Coxiella burnetii*, patojenik, hücre içi, gram negatif karakterli bir bakteridir. Q humması hastalığına neden olan etkindir. “Q”, “query” yani “şüpheli” anlamına gelir ve şimdiye kadar bu hastalığın ilk salgınının gözlemlendiği Avustralya’nın Brisbane’de uzun süredir teşhis edilmektedir. Bu ateşli hastalık salgını 1935’te Brisbane’de bir mezbahada çalışan dokuz hastada gözlenmiştir. Edward Derrick, deney hayvanı olarak kullandığı gine piglere (kobay ailesi) hastalardan aldığı kanı enjekte ederek Q humması hastalığını gine piglere aktarmış ve zonooz olduğunu kanıtlamıştır. Fakat etkeni izole edip, bulaşıcı ajanı görselleştirme girişimleri başarısız olmuştur (Derrick 1937). Enfekte kobay dokusunu deney hayvanlarında karakteristik ateşli reaksiyonu oluşturan Mavis Freeman ve Frank Macfarlane Burnet’e göndermiştir. İkili tarafından ajanın “zorla filtrelenebilir” olduğunu ve enfekte olmuş dalak dokusunun yayma preparatlarında “riketsiya doğası” gibi görünen organizmalar içerdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Q humması hastalığından iyileşen hastaların serumuyla karıştırıldığında, enfekte kobaylardan berraklaştırılmış doku süspansiyonlarının aglütine olduğunu gözlemlemiş, ancak aynı süspansiyonların tifüs riketsiyası olan hastalardan alınan serumlarla reaksiyona sokulduğunda aglütine olmadığını gözlemlemişlerdir (Burnet ve Freeman, 1937). Etkenin riketsiyalara benzerliğinden dolayı Burnet, ajanına “Rickettsia burnetii” adını vermiştir (Davis ve Cox, 1938).

ABD, Montana, Hamilton’da neredeyse aynı zamanlarda, Rocky Dağlarının ekolojisi üzerine yapılan saha tarama çalışmalarında bilinmeyen bir ajan keşfedildi. Montana, Nine Mile’da toplanan ve gine pig kobaylarından beslenen *Dermacentor andersoni* kenelerinden Rocky Mountain benekli hummasını taklit etmeyen ateşli bir hastalık sunumu yapılmıştır. Sunumda bu Nine Mile ajanının, kobaylarda seri olarak pasajlanabildiği, filtrelenebildiği ve aksenik kültürde üremediği gösterilmiştir, bu bilgiler ışığında ajanın tıpkı *Francisella tularensis* etkeninde olduğu gibi “gerçek” bir bakteri olup olmadığı konusunda tartışmalara neden olmuştur. Etken, Davis ve Cox’a göre hem bakteriyel hem de viral özelliklere sahiptir (Davis ve Cox, 1938).

Nine Mile ve Q humması etkenleri arasında bağlantı Nine Mile ajanının laboratuvarında oluşturulan deneysel enjeksiyon sayesinde rastlantı eseri keşfedilmiştir. Hasta, Q hummasına oldukça benzeyen belirti ve semptomlar sergilemiş (Dyer, 1938) ve sonraki cross protection çalışmaları, Q humması ve Nine Mile etkenlerinin büyük olasılıkla aynı patojen olduğunu doğrulamıştır (Dyer, 1939). Organizma tam olarak tipik bir riketsiya gibi davranmadığından, etken, sırasıyla Cox ve Burnet onuruna Rickettsiaceae familyasında “Coxiella” cinsi ve “burnetii” türünde yeni bir cinse yerleştirildi ve “Coxiella burnetii” ismi verildi (Maurin ve Raoult, 1999). *C. burnetii*’nin keşfinin erken tarihi ve geçmiş kilometre taşları, McDade (1990) tarafından ayrıntılı olarak anlatılmıştır. *C. burnetii*, moleküler taksonomi çalışmaları, filogenetik olarak bu düzenin üyeleriyle daha yakından ilişkili olduğunu gösterdikten sonra Legionellales takımına taşınmıştır.

Etkenin Avrupa’da görülmesi 1941’de Alman Birliklerinin Yunanistan sınırlarına girdiği zamanlarda uyumak için samanlarda yatmasına dayanmaktadır. O sıralarda Alman askerlerinde atipik pnömoni şeklinde patlak veren salgına ilk başlarda Balkan Gribi dense de *C. burnetii*’nin neden olduğu tespit edilmiş, 1980’lere kadar da lokal ve sporadik şeklinde seyir göstermiştir. ABD, 1942’de Fort Detrick’te başlayan saldırgan biyolojik programı sırasında silah olarak kullanılabilecek ajanlar arasında Q hummasını sıralamıştır. 1954’te, ABD’ye silahlanmadan hizmet etmek isteyen Yedinci Gün Adventist Kilisesi’nin gönüllü üyeleri, Beyaz Önlük Projesi adı verilen proje sırasında *C. burnetii*’nin aerosollerine maruz kalmışlardır (Christopher ve diğerleri, 1997). İkinci Dünya Savaşı’ndan önce Rusya’nın Q hummasını biyolojik bir silah olarak ürettiği bildirilmiştir (Alibek, 1999: 29–38). 1987’de Oxfordshire, İngiltere’de tanımlanan bir Q humması salgını postacıları etkiledi. Posta işçileri de 2001 yılında ABD’de şarbon biyoterörist saldırılarının kurbanı oldular. Oxfordshire’daki salgın biyoterörizmle ilgili değildi. Kaynak hiçbir zaman bulunamamasına rağmen, kırsal alanlardan toplanan postaların *C. burnetii* ile kirlenmiş materyali postaneye getirdiği öne sürüldü (Winner ve diğerleri, 1987). Hastalık salgınları değerlendirildiğinde 1999-2004 yılları arasında insan, çiftlik hayvanları, yabani hayvanlar ve pet hayvanlarına ait 12 farklı ülkede, toplam 18 salgının olduğu bildirilmektedir (Angelakis ve Raoult, 2010).

*Coxiella burnetii*’nin ülkemizde gözlemlendiği ilk bulgu 1946’da Balkanlardan ihraç edilen hayvanlardan alınan kan serumlarında bulunan antikor varlığıdır. 127 adet keçinin 12 adedinde antikor pozitifliği bildirilmiştir. İlk salgın ise 1948’de Aksaray Ozancık Köyünde koyun yünlerinde bulaştığı düşünülen aerosollerin solunması sonucunda olduğu bildirilmiştir. 1947 ile 2002 yılları arasında *Coxiella burnetii* salgını rapor edilmemiş ancak analizlere

devam edilmiştir. 2002’de Tokat ve çevresinde toplamda 15 vakada Q humması teşhisi konulmuştur (Kılıç ve Çelebi, 2008). Berberoğlu ve diğerleri (2004)’nin yaptığı bir çalışmada; sağlıklı hayvanlarda yaptıkları çalışmada Antalya’da % 13,2, Diyarbakır’da % 6 ve Samsun’da ise % 1,8 oranında seropozitiflik saptamışlardı. Doğu Anadolu’da 8 farklı bölgede yaptıkları çalışmalarında sığırlarda % 5,8, koyunlarda ise % 10,5 oranında pozitiflik saptamışlardır (Çetinkaya ve diğerleri, 2010). Aynı çalışmada çiftçilerde ve mezbaha işçilerinden alınan kan serumlarında % 12 oranında seropozitiflik gözlenmiş ve seropozitif olan çiftçilerin tamamının seropozitif hayvanları olduğu gözlenmiştir.

## 2.2. Bakteri Özellikleri

16S rRNA kodlayan gen dizisine dayalı olarak, *Coxiella burneti*, Rickettsiales takımından Proteobacteria filumuna, sınıf Proteobacteria, Legionellales takımına, Coxiellaceae familyasına yeniden sınıflandırılmıştır (Waag ve Thompson, 2005). *C. burnetii* genomik olarak %42.2 guanozin ve sitozin içeriğine sahiptir ve bu, Rickettsiales takımından (~%29 G+C) çok Legionellales takımının üyelerine yakındır. *C. burnetii* suşlarının genom boyutunun başlangıçta düşük çözünürlüklü darbeli jel elektroforezi temelinde ~1.5 ila 2.4 Mb arasında olduğu tahmin ediliyordu (Willems ve diğerleri., 1998), ancak genom dizilimi şimdi ~2.0 ila 2.2 Mb aralığını göstermektedir. Coxiella genomu, hemen hemen tüm diğer tıbbi açıdan önemli cins gruplarından daha fazla temel proteini (ortalama pI 8,25) kodlamaktadır (Waag ve Thompson, 2005).

Bakteri küçük bir Gram-negatif, pleomorfik, flagellasız, 0.2-0.4µm x 0.4-1.0µm büyüklüğünde, kapsülsüz, hareketsiz, kokobasil şekline sahiptir. Zorunlu hücre içi ve yüksek ozmotik dirence sahiptir. Ayrıca Amerikan Savunma Dairesi Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri CDC’nin yayınladığı listede biyoterör ajanları sınıflandırmasında B kategorisinde yer almaktadır. Etken UV ışınlarına, pH 4.5 derecedeki asit yoğunluğuna, 300 000 kPa gücündeki basınca karşı fiziksel dirence sahiptir. 72°C’de 40 sn pastörizasyon protokolünde canlılığını yitirir. Kuru tozda 120 gün, taze sütte buzdolabı ısısında 40 ay, yünde 12 ay, soğukta bekletilen ette 1 ay, idrarla konamine alanlarda 49 güne kadar canlılığını ve infektivitesini koruyabilmektedirler (Health ve Journal, 2010). Faz I ve faz II olmak üzere iki fazlı bir gelişim döngüsü içeren morfolojik olarak farklı iki hücre tipi üretir. Faz I virülens formu iken faz II formu ise daha az virülense sahiptir ve in vitro ortamlarda bu forma

dönüşürler. Küçük hücreli varyantının, karakteristik yoğunlaştırılmış kromatini ile, kuruma ve ısı gibi çevresel stres faktörlerine karşı geliştirilmiş direnci olan hücre dışı hayatta kalma formu olduğu düşünülmektedir. Küçük hücre varyantı konakçıyı istila ettiğinde, metabolik ve bölünme açısından aktif olan büyük bir hücre varyantına dönüşür. Büyük hücrenin küçük hücre varyantına farklılaşması, organizmanın büyüme döngüsünün durağan fazı sırasında meydana gelir ve yüzey proteinlerindeki değişiklikleri içerir. Ancak yüzey proteinlerindeki lipopolisakaritteki (LPS) değişiklikler şu ana kadar çalışılmamıştır. Büyük hücreli varyantın başlangıçta küçük hücreli varyantın öncüsü olarak hizmet eden bir endospor üretmesi öngörülmüştür (Waag, 2007).

Hastalıkta konak çeşitliliği oldukça yüksek olup insanlar, ruminantlar, köpek, kedi, kanatlılar, sürüngenler ve eklembacaklıları konakları arasında bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlara, *C. burnetii*'nin bulaşması birçok kaynak ile olabilmektedir. Hastalığa bağlı abort yapmış hayvanların özellikle plasentaları olmak üzere aborte fetüs, doğum akıntıları süt, vaginal akıntı, dışkı ve idrar gibi çeşitli yollar ile bakteri konak dışı ortama saçılmaktadır. İnsanlar için bulaş kaynakları genel olarak hayvancılıkla uğraşanlar için enfekte hayvanların atık materyalalarına temas, hayvancılıkla uğraşmayan kişilere ise pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleridir. *C. burnetii* kenelerle ve insektlerle de insan ve hayvanlara bulaşmaktadır. Sığır, koyun ve keçiler insanlara bulaşmada rezervuar olarak kabul edilmektedir. Kontamine olmuş çevre ortamındaki toz ile bakterinin oluşturduğu partiküller rüzgar ile bakterinin farklı bölgelere yayılmasına neden olduğu gibi bulaşma kaynağı olarak kabul edilmektedir. Enfekte insanlardan sağlıklı insanlara bulaşma nadirdir (Özbey ve diğerleri, 2009).

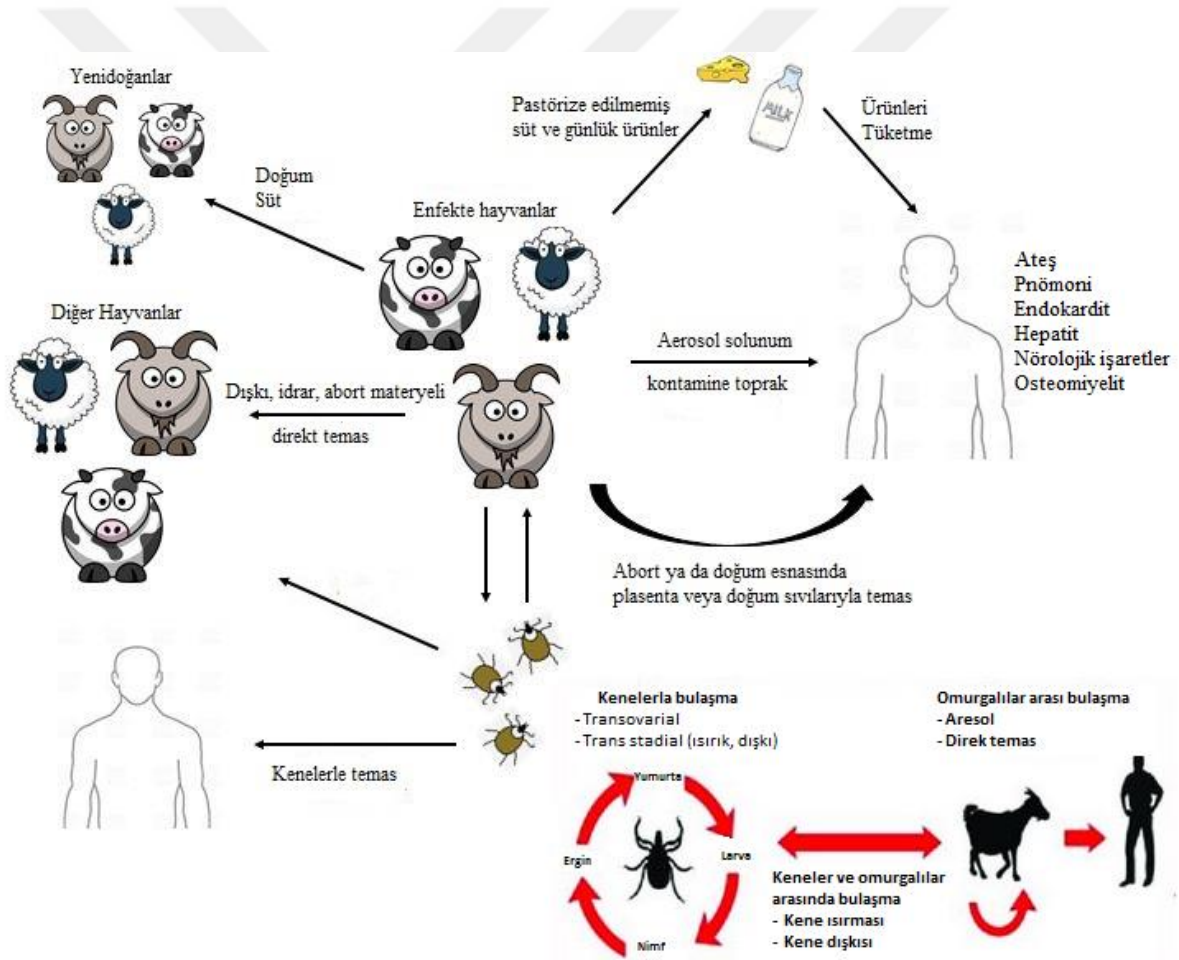
### 2.3. Epidemiyoloji

Zoonotik patojen olan *Coxiella burnetii*'nin yol açtığı enfeksiyon, Yeni Zelanda istisnası dışında dünya çapındadır (Maurin ve Raoult, 1999). *C. burnetii*'nin ruminantlarla güçlü bir ilişkisi vardır ve bu hayvanlar ve ürünleri ile temas, insanların Q humması patojenine maruz kalmasının birincil yoludur. (Raoult ve diğerleri, 2005). Bununla birlikte, doğal rezervuarların aralığı geniştir. Hem vahşi hem de evcil memelileri, kuşları ve keneler gibi eklembacaklıları içerir (Maurin ve Raoult 1999).

Enfekte keneler, *C. burnetii* enfeksiyonunun doğal döngüsünün devam etmesinde önemli role sahiptirler. Endemik bir bölgede duyarlı bir konakçıyı parazitleyen her kene

türünün *C. burnetii*'yi saçması muhtemeldir. 40'dan fazla kene türü Q-Fever etkenini saçılımı hem vertikal olarak yani transtadiyal veya transovarial olarak nesillerine hem de horizontal olarak yani ısırık veya dışkı yoluyla yabani omurgalılara ve yabani kuşlara iletebilir. *C. burnetii*'nin en sık vektörü olan kene türleri, *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* ve *Dermacentor* cinslerine aittir (Parola ve Raoult, 2001).

Çoğu hayvanda, *C. burnetii* hastalığı neden olmaz. Koyun ve keçiler haricinde, dişi üreme sisteminde mikroorganizmanın büyük ölçüde çoğalması geç dönem abortlarına neden olmaktadır. Memeliler bakterileri idrar, dışkı, süt ve plasenta ve amniyotik sıvı gibi doğum ürünleri yoluyla saçarlar. Çevrede yıllarca canlı kaldığı yerde hava akımları tarafından geniş çapta dağılır. (Tissot-Dupont ve diğerleri, 2004).



**Resim 1.** *Coxiella burnetii* bulaş döngüsü.

Enfeksiyon insanlara öncelikle kontamine toz veya aerosollerin solunması yoluyla bulaşır. *C. burnetii*'nin enfekte koyun veya ineklerden pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketimi yoluyla bulaşması gerçekleşir ancak aerosol bulaşmasından daha az etkilidir. Ek

olarak, keneler, belirtilen rezervuarlara rağmen, hastalığı insanlara önemli bir şekilde yönlendirmezler. *C. burnetii* enfeksiyonu, çiftlik hayvanlarının atıkları ve doğum ürünleri ile veya çevresinde çalışan kişiler için mesleki bir tehlike olarak kabul edilmektedir ve çiftçiler, veteriner hekimler, hayvanat bahçesi ve mezbaha çalışanlarını içerebilir (Rodolakis, 2009). Oksitetrasiklin tedavisi sonrası ticari bir sütçü koyun sürüsünde dışkılama kinetiği, bakterilerin doğumdan sonra 5 ay süreyle dışkıyla, 3 ay süreyle vajinal akıntılarla ve 4 ay süreyle sütle atıldığını göstermiştir. Bu veriler tedavinin bakterinin atılımını engellemediğini veya bakteriyel atılım süresini sınırlamadığını düşündürmektedir (Astobiza ve diğerleri, 2010).

Amerika Birleşik Devletleri'nde *C. burnetii*'nin çevrede yaygın olarak dağıldığı gösterilmiştir. Örneğin, çeşitli yerlerden (ör., mandıralar, bakkallar) alınan örneklerin %28'i, IS1111 dizisi için kantitatif PCR ile belirlendiği üzere *C. burnetii* DNA'sı içeriyordu. Bu çalışmayı tamamlayan, ABD'de Q hummasının genel seroprevalansının %3.1 olduğunu gösteren yeni bir sero-anket. Prevalans erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir (sırasıyla %3,8 ve %2,5), antikor pozitifliği yaşla birlikte artar. Toplu olarak, bu veriler ABD'de insanların *C. burnetii*'ye maruz kalmasının, bildirilen Q humması vakalarının sayısından çok daha yaygın olduğunu göstermektedir. Bildirilmeyen subklinik veya asemptomatik enfeksiyonlar muhtemelen yüksek seroprevalans oranlarına önemli katkıda bulunur (Kersh ve diğerleri, 2010). Danimarka'da, süt çiftliklerinde mesleki temaslara ilgili yakın zamanda yapılan bir sero-anket, 359 kişiden 39'unun seropozitif olduğunu göstermiştir ve ankete katılan veteriner hekimler %36 ile en yüksek pozitiflik oranına sahiptir (Bosnjak ve ark. 2010). Veteriner hekimliği ile ilişkili mesleki bir risk olarak Q humması, ABD veteriner hekimlerinin yüksek seropozitiflik oranı (yaklaşık %22) ile de gösterilmektedir (Kersh ve diğerleri, 2010).

Son zamanlardaki birkaç Q humması salgını, patojenin dünya çapında ne kadar yaygın olduğunu göstermektedir. İsrail'de, bir okulda büyük bir Q humması salgınının nedeni olarak klima sistemi gösterilmiştir. Bu salgından çıkartılan sonuçta influenza benzeri hastalığın sebepleri ve nedenleri araştırılırken, *C. burnetii* enfeksiyonunun dikkate alınması gerektiğidir (Amitai ve diğerleri, 2010). Şimdiye kadar kaydedilen en büyük Q humması salgını, hastalığın önceden yaygın olmadığı güney Hollanda'da meydana geldi (Enserink, 2010). 2007'den 2009'a kadar olan 3 yıllık bir süre içinde üç bin doğrulanmış insan vakası meydana geldi ve sadece 2009'da altı ölüm dahil 2.300 vaka meydana geldi. Salgın, açıkça yüksek yoğunluklu süt keçisi yetiştiriciliği ile ilişkilidir. (Amitai ve diğerleri, 2010).

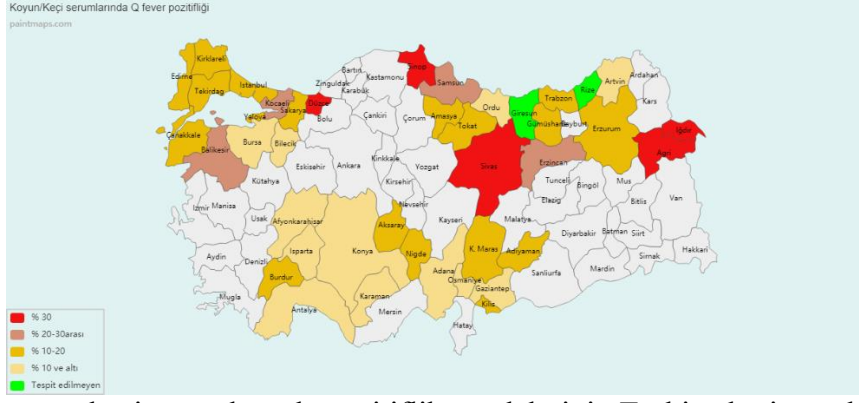
*C. burnetii* “radar” altında tutulan bir etkidir. İzlenen etkenler kategorisinde olmasının nedenleri arasında; Faz II formuyla olumsuz hava koşullarında ya da in vitro ortamda canlılığı sürdürmesi, organizmanın çevresel koşullara direnci, aerosol iletimi ve düşük enfeksiyöz dozda enfeksiyon oluşturmaya gösterilebilir. Ayrıca *C. burnetii*’nin B sınıfı biyolojik savaş ajanı olarak potansiyeli de radar altında olmasının nedenleri arasındadır. (Madariaga ve diğerleri, 2003).

#### 2.4. *Coxiella burnetii*’nin Türkiye’de Güncel Prevalansı

2013-2014 yıllarında gerçekleştirilmiş olan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü TAGEM/HSGYAD/13/AO7/P02/31 No’lu projede Marmara, Karadeniz, Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde yetiştirilen koyun ve keçi kan serumları toplanmış, Q humması hastalığının seroprevalansı araştırılmıştır. Projede toplam 6018 küçükbaş hayvanın kan serumunda 887 (%14,7)’sinde seropozitiflik tespit edilmiştir. Serumlar *Coxiella burnetii* antikorlarının varlığını test etmek için Ab ELISA kit ile test edilmişlerdir. Sürü pozitifliği % 30-60 arasında genel dağılım göstermektedir. Proje sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Koyun ve keçi serumlarının Türkiye geneli yüzde dağılımları Şekil 1.’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Bölgelere Göre Toplu Koyun /Keçi Serum Sonuçları

| Bölgeler     | İşlenen Toplam Serum | Pozitif | Negatif | %     |
|--------------|----------------------|---------|---------|-------|
| Marmara      | 742                  | 134     | 608     | 18    |
| Doğu Anadolu | 742                  | 186     | 556     | 25    |
| Karadeniz    | 379                  | 70      | 309     | 18,46 |
| Akdeniz      | 1712                 | 220     | 1492    | 12,85 |
| İç Anadolu   | 2443                 | 277     | 2166    | 11,3  |
| TOPLAM       | 6018                 | 887     | 5131    | 14,7  |



**Şekil 1.** Koyun ve keçi serumlarında pozitiflik yüzdelerinin Türkiye haritasında dağılımları.

Aynı projenin Sığırlardaki Q humması hastalığının seroprevalansı araştırılması çalışmasında 22 ilden toplam 1114 serum Ab ELISA kit ile incelenmiş olup 201 serumda *C. burnetii* antikorları yönünden pozitiflik tespit edilmiş ve 913 serum negatif bulunmuştur. İllere göre % pozitiflik oranı 2,3 ile 35,2 arasında değişmektedir. Ortalama pozitiflik oranı % 18'dir.



**Şekil 2.** Sığır serumlarında pozitiflik yüzdelerinin Türkiye haritasında dağılımları.

Sığır, koyun ve keçi serumlarında Ab ELISA ile *C. burnetii* antikorları yönünden pozitifliğin tarandığı bu projede, Ülke genelinde sığırlarda seropozitiflik % 18 ve koyun/keçilerde ise % 14,7 olarak tespit edilmiştir.

Koyun ve keçi serumlarında bölgeler arasında seropozitiflik oranları genel olarak birbirine yakın bulunmuştur. Yine koyun ve keçi serumlarında iller arasında seropozitiflik oranında farklılıklar bulunmakla birlikte (% 5 altı ve % 30 ve üstü gibi) kümelenme daha çok %10-ila 20 tespit edilmiştir. Benzer durum sığır serumlarında da gözlenmektedir. Ülkemizde farklı metotlar kullanılarak yapılan ve yayınlanan diğer araştırmalarada ise

- Doğu Anadolu Bölgesinde sığırlarda %5,8-26,3, küçükbaş hayvanlarda %10,5-28,6
- Marmara Bölgesinde Bölgesinde sığırlarda %1,1-26,3, küçükbaş hayvanlarda %2,8-20,0
- Ege Bölgesinde Bölgesinde sığırlarda %4,3-21,7, küçükbaş hayvanlarda %3,0-10,0
- İç Anadolu Bölgesinde Bölgesinde sığırlarda %12,4-25,5, küçükbaş hayvanlarda %6,6-25,7
- Akdeniz Bölgesinde Bölgesinde sığırlarda %9,2, küçükbaş hayvanlarda %29,6 oranında seroprevalans olduğu bildirilmektedir (Kılıç ve Çelebi, 2008).

Marmara bölgesinde (Bursa, Balıkesir ve Çanakkale) koyunlarda Q humması seroprevalans çalışmasında 42 koyun sürüsünde örnek alınan koyunların 151 adedinin (%20) seropozitif olduğunu tespit edilmiş olup örnek alınan 42 sürünün %81'inin sürü bazında seropozitif olduğu ortaya konulmuştur (Kennerman ve diğerleri, 2010).

Konya bölgesinde sığırlarda yapılan araştırmada 322 adet sığırın %12,4'ünde seropozitiflik tespit edilmiştir (Gazyacı ve diğerleri, 2011). Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde sığır, koyun ve keçilerin aborte fetüslerinin abomazum içerikleri ve kotiledonlarında Coxiella burnetii'nin PCR ile teşhisi CB-PCR ve Trans PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. Yürütülen araştırmada aborte fetüslerin abomazum içeriklerinin %37 (22/59)'unda, kotiledon örneklerinin ise %32,2 (19/59)'unda Coxiella burnetii tespit edilmiştir. Teşhiste kullanılan CB-PCR ve Trans-PCR yöntemlerinin birlikte kombinasyonlarının kullanılmasının ve abomazum içeriklerinin örnek olarak daha iyi teşhis değeri taşıdığı bildirilmiştir (Cantaş ve diğerleri, 2011).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise farklı bölgelerde farklı metotlarla yapılan seroprevalans çalışmalarında pnömoni tanısı konulan insanlarda %2-47, kalp damar hastalığı olanlarda %11,1-56, genel popülasyon %4,5-20,8, Veteriner Hekimlerde %7,2-30,6 oranında olduğu araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Kılıç ve Çelebi, 2008). Çiftlik hayvanlarında hastalık genel olarak asemptomatiktir. Hastalığın temel belirtisi bazen sadece abort, ölü doğum veya zayıf doğum şeklinde görülmektedir. Q humması insanlarda akut dönemde pnömoni tablosu, kronik dönemde ise kardiovasküler bozukluklarla karakterizedir (Bauer ve diğerleri, 2017).

Gozalan ve ark. (2010) Samsun bölgesinde 2002 yılında meydana gelen Q humması salgını üzerine tesadüfi olarak 407 kişi üzerinde seroprevalans çalışması yürütmüştür.

Çalışmada sağlıklı olan insanların %13,5'inde seropozitiflik tespit edilmişken seropozitifliğin en yüksek olarak avcılarda ve mezbahane çalışanlarında tespit etmişlerdir.

## 2.5. Bakterini Yaşam Döngüsü

*C.burnetii*'nin yaşam döngüsü; ilk olarak ökaryotik hücreye spor veya küçük hücreli varyant'ın invaze olmasıyla endozomun yaklaşık pH 5.5'e kadar asitleşmesiyle başlar. Sonrasında enine oranla iki parçaya çoğalan küçük hücreli varyantlar büyük hücreli varyantlara doğru evrilir. pH 4.5 kadar asitleşen ortamda fagolizozomun asidifikasyonu sonrasında büyük hücreli varyant aynı küçük hücreli varyanttaki gibi enine oranla füzyona uğrar ve çoğalır. Kutup kısımlarında endospor oluşur ve küçük hücreli varyanta doğru farklılaşır. Oluşan spor ve küçük hücreli varyant hücre dışına çıkar (Arricau-Bouvery ve Rodolakis, 2005.)

### 2.5.1. Küçük ve Büyük Hücre Varyantları

*C. burnetii*, *Chlamydia spp.* gibi farklı hücre varyantlarını içeren çok ilgi çekici bir yaşam döngüsüne sahiptir. Enfeksiyöz partiküller, tipik olarak çubuk şeklinde ve yüksek oranda yoğunlaştırılmış kromatin ile 0,2 – 0,5 µm uzunluğunda olan küçük hücre varyantları (SCV) olarak adlandırılır. SCV, hücre dışı ortamda bulunan formudur ve ısıya, kurumaya, ozmotik şoka, UV ışığına ve çeşitli kimyasal dezenfektanlara karşı oldukça dirençlidir. *C. burnetii*, son derece dirençli olmasının yanı sıra, SCV gibi metabolik olarak aktif değildir. Başlangıçta, McCaul ve Williams'ın büyük hücre varyantlarında (LCV) spor benzeri bir partikül gözlemledikleri için, *C. burnetii*'nin SCV'ye dönüşen sporlar üretebileceği öne sürüldü. Bununla birlikte, bu parçacıkların spor boyası (dipikolinik asit) ile boyanamaması bu hipotezi desteklemez. Ve genom dizilimi, oluşum için tam bir homolog eksikliğini göstermiştir. LCV'ler tipik olarak pleomorfiktir, metabolik olarak aktiftir ve 1 µm'yi aşabilir. Endozom, parazitofor bir vakuole (PV) olgunlaşmaya başlar ve *C. burnetii*, SCV'den LCV'ye geçişi başlatır. Bu kayma, PV'nin asitlenmesine yanıt olarak meydana gelir (pH 4.7-4.8). Enfeksiyondan 8 saat sonra hem SCV hem de LCV içeren PV'ler görüntülenebilir, ancak enfeksiyondan 16 saat sonra PV'ler yalnızca geçişin tamamlandığını gösteren LCV içerir.

SCV'den LCV'ye bu dönüşüm, replikasyon olmadan gerçekleşir ve büyümede ilk gecikme dönemi olarak sınıflandırılmıştır (Coleman ve diğerleri, 2007).

Konakçı hücrelerdeki bu geçiş, muhtemelen kromatin yoğunlaşmasında rol oynayan oldukça temel bir DNA bağlayıcı protein olan ScvA'nın kaybıyla ilişkilidir. LCV'nin büyümesi, enfeksiyondan 2 ila 6 gün sonra gözlenir, ardından iki fazlı yaşam tarzını tamamlayan ScvA, pozitif SCV *C. burnetii*'nin yeniden ortaya çıkması izlenir. Bu hücre içi morfojenезin *C. burnetii*'nin virölansı için gerekli olduğu ve bu nedenle, bu iki hücre varyantı arasında farklı şekilde eksprese edilen proteinlerin, immün sistemden kurtulup dahil olma gibi potansiyel virölans faktörleri olabileceği varsayılmaktadır. İlk çalışmalar, SCV ve LCV'nin protein profillerinin farklı olduğunu göstermiştir. 2D jel elektroforezi kullanılarak yapılan proteomik analiz, LCV'lerde SCV'lerden iki kat daha fazla miktarda bulunan 48 protein olduğunu belirlenmiştir. Bu 48 proteinden sadece 15'i MS ile karakterize edildi ve şaşırtıcı olmayan bir şekilde, bu proteinlerin bir kısmının hücresel bölünme ve ribozomal fonksiyonlarla ilişkili olduğu tahmin edildi ve LCV'lerin metabolik olarak daha aktif form olmasıyla iyi bir korelasyon. Bu çalışmada tanımlanan varsayımsal proteinlerin işlevini belirlemek ve yeni virölans faktörleri içerebilen diğer 33 farklı şekilde eksprese edilmiş proteini karakterize etmek için daha ileri çalışmalar gerekecektir. SCV'lerde en az iki kat daha fazla bulunan altı protein vardı ve bunlar, monositlerin ve makrofajların *C. burnetii* istilasından önce doğuştan gelen gözetimin bağışıklıktan kaçmasına dahil olan faktörleri içerebilir. Sonuç olarak, *C. burnetii*'nin bifazik yaşam tarzı, ortamda konak makrofajlarının istilası üzerine enfektif forma dönüşen stabil bir form sağladığı için açıkça bir virölans mekanizması olarak kabul edilebilir (Coleman ve diğerleri, 2007)

*C. burnetii* içeren endozomlar, konak hücreye dahil edildikten sonra, lizozomal özelliklere sahip bir parazitofor vakuole (PV) evrilmek üzere bir dizi olgunlaşma aşamasından geçer. Tipik olarak fagositoz yoluyla hücreye aktarılan bakteriler fagolizozomda öldürülür ve parçalanır. *C. burnetii*, bu zorlu ortamda hayatta kalma ve çoğalma yeteneği açısından benzersizdir. Normal fagozomal olgunlaşma, füzyon ve fisyon olaylarıyla sırayla farklı proteinler elde eden bir dizi artan asidik fagozom yoluyla ilerler (Heinzen ve diğerleri, 1999).

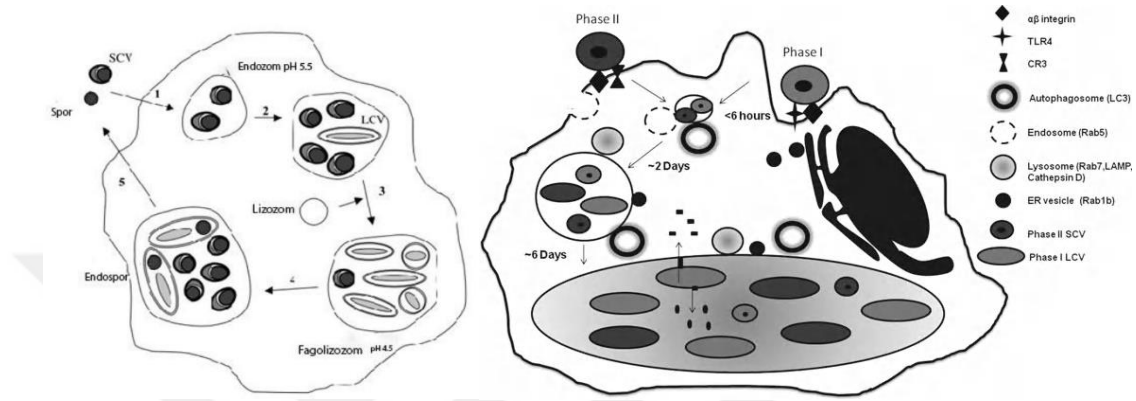
Parazitofor vakuole olgunlaşma, *C. burnetii* tarafından protein sentezi ile ilişkilidir ve büyük replikatif vakuole geçiş için ~24-48 saat gerekir. Formalinle sabitlenmiş ve metabolik olarak aktif *C. burnetii*'nin her ikisi de lizozomal enzim asit fosfataz içeren PV bölmelerinde bulunur, ancak sentezlenme kinetiği farklıdır. Metabolik olarak aktif *C. burnetii* içeren PV, asit fosfataz alımı ~2 saate kadar geciktirilebileceğinden olgunlaşması durdurulur. Bu, *C.*

*burnetii*'nin bu bölmeyi aktif olarak değiştirdiğini ve fagositozdan sonra meydana gelen olaylarda sadece pasif bir seyirci olmadığını göstermektedir. Bu olaylara aracılık eden mekanizmalar açıkça virülans mekanizmalarının örnekleridir, ancak spesifik proteinler henüz tanımlanmaya başlamaktadır. Örneğin, Howe ve arkadaşlarının yakın tarihli bir çalışmasında, tip IV salgılama aparatının hücre içi replikasyon için gerekli olduğunu göstermiştir, bu da efektörlerin PV'nin membranından salgılanmasının, *C. burnetii*'nin olgunlaşması ve replikasyonu için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, bu bölme yüksek derecede füzogenik olduğu ve hem endositik hem de fagositik yollar ile etkileşime girdiği için statik değildir. İlginç bir şekilde, yeni veriler PV'nin ER ile etkileşime girdiğini gösteriyor; PV, erken salgı yolundan türetilen veziküllerin bağlanmasına izin verebilen Rab1b ile süslenmişti. ER ile etkileşim, *C. burnetii* replikasyonu için gerekli olan büyük PV'yi üretmek için bir zar kaynağı sağlayabilir, bu da bu bölümün statik olmadığı fikrini destekler. PV zarı, lizozom benzeri bir bölme için alışılmadık olan kolesterol açısından zengindir. Ayrıca, *C. burnetii* enfeksiyonu, büyümenin orta-log fazı sırasında kolesterol üretiminde yer alan genlerin ekspresyonunda bir yukarı regülasyona neden olur, bu noktada PV, dahili konak hücre hacminin çoğunu kaplar (Howe ve Heinzen, 2006; Coleman ve diğerleri, 2004).

*C. burnetii*, yalnızca 16S rRNA gen dizilimi ile incelendiğinde önemli ölçüde genetik homojenlik gösterir. Bununla birlikte, kısıtlama parçası-uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve mikrodizi bütün genom karşılaştırmaları, izolatlar arasındaki genetik çeşitliliği gösteren, sırasıyla bantlama ve hibridizasyon modellerinde önemli heterojenliği ortaya koymaktadır. Otuz iki izolat altı farklı genomik gruba (I'den VI'ya) sınıflandırılmıştır. I, II ve III'üncü genomik grupların içindeki insan izolatları akut evredeki hastalardan türetilmişken, genomik grup IV ve V içindeki insan izolatları kronik evredeki hastalardan elde edilmiştir. Genomik grup VI'daki organizmalar, Utah, Dugway yakınlarındaki kemirgenlerden izole edildi. Çoğu izolat, QpH1, QpRS, QpDV ve QpDG olarak adlandırılan, otonom olarak replike olan dört plazmitten birini barındırır. Bu plazmitlerin boyutu 32 ila 42 kb arasında değişir ve benzersiz bölgelerle birlikte ortak bir 25 kb “çekirdek” bölgesini paylaşır. Plazmit içermeyen suşlar, kromozomlarına entegre edilmiş plazmit dizileri içerir. (Cohen, Lajhtha, ve diğerleri, 2012).

*C. burnetii*'nin genetik çeşitliliği, antijenik ve yapısal olarak benzersiz LPS moleküllerinin mevcudiyeti ile ayrıca kanıtlanır. Spesifik genomik gruplarla ilişkili üç farklı LPS kemotipi tanımlanmıştır. LPS kemotipi ile virülans potansiyeli arasında potansiyel bir bağlantı düşünülmüştür. Doğal kaynaklardan ve enfeksiyonlardan izole edilen virulent, *C. burnetii*'nin tümü, serolojik olarak “faz I” olarak tanımlanan tam uzunlukta bir LPS veya

konakçısı için virülen olan pürüzsüz varyant üretir. Embriyonlu yumurtalarda veya doku kültüründe faz I, *C. burnetii*'nin seri in vitro geçişi, azalan moleküler ağırlıklara ve farklı bileşen şeker bileşimlerine sahip LPS molekülleri ile sonuçlanır, bu da avirulent “faz II” organizmaların veya kaba tipte kesik LPS ile sonuçlanır. Faz II LPS, faz I LPS'ninkine özdeş bir lipid A içerir ve bazı çekirdek şekerlere sahiptir (Cohen, Lajth, ve diğerleri, 2012).



**Şekil 3.** Ökaryotik hücrede *C. burnetii*'nin varsayılan gelişimsel döngüsünün modeli (Arricau-Bouvery N ve diğerleri 2005). (1) Sporun veya SCV'nin ökaryotik hücreye girişi ve fagozomun endozomunun (yaklaşık pH 5.5) asitlenmesi. (2) Küçük hücreli varyantların (SCV) çapraz ikili fisyon ve büyük hücreli varyantlara (LCV) farklılaşma yoluyla çoğaltılması. (3) Endozomun lizozomla füzyonu, fagolizozomun asitleştirilmesi (yaklaşık pH 4.5). (4) LCV'nin enine ikili fisyon, LCV'nin SCV'ye farklılaşması ve LCV'de polar endospor gelişimi ile çarpımı. (5) Sporun ve SCV'nin hücre dışına salınması.

## 2.6. *C. burnetii* İzolatlarının Çeşitleri

*C. burnetii* suşlarının ayrımı, geleneksel serolojik yöntemler izolatlar arasında ayrım yapamadığı için başlangıçta zor olarak kabul ediliyordu. LPS bantlama modellerindeki veya plazmit tipi belirlemedeki farklılıklara dayalı olarak izolatları ayırt etmeye yönelik ilave girişimler ise sınırlıydı. Bu nedenle, *C. burnetii* suşları, izolasyon kaynakları, coğrafi kökenleri ve klinik belirtileri ile tanımlanmıştır. Bununla birlikte, *C. burnetii*'nin son derece geniş konakçı yelpazesi ve insanlarda neden olduğu geniş hastalık spektrumu, izolatların farklılaşmasını hem epidemiyoloji hem de teşhis için son derece önemli kılmaktadır. Yakın zamana kadar *C. burnetii*'nin aksenik besiyerinde yetiştirilememesi, bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonların teşhisini zorlaştırmış ve tek bir farklılaşma şemasına uymayı zorlaştırmıştır (Omsland ve diğerleri, 2009).

DNA hibridizasyonu, *C. burnetii* izolatları arasında düşük derecede genetik heterojenlik gösterir. Bununla birlikte, 32 *C. burnetii* suşundan izole edilen DNA'nın restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP), izolatların DNA parmak izi temelli altı farklı genomik gruba farklılaşmasıyla sonuçlanmıştır. İlginç bir şekilde, grup I, II ve III'ten elde edilen izolatlar akut enfeksiyonları temsil ederken, grup IV ve V, kronik enfeksiyonlardan gelenleri temsil eden izolatlardan oluşuyordu. Bu genotip gruplamaları daha sonra darbe alanı jel elektroforezi (PFGE) kullanılarak doğrulandı (Heinzen ve diğerleri, 1999). Avrupa, ABD, Afrika ve Asya'dan izole edilen 80 adet *C. burnetii* suşundan PFGE ve DNA kullanan daha ileri çalışmalar, 16 kısıtlama grubu tanımlandı ve RFLP modellerini coğrafi kökenle ilişkilendirildi, bu da *C. burnetii*'nin homojen bir tür olarak kabul edildi. Daha yakın zamanlarda, 14 adet *C. burnetii* izolatlarından IS1111 transpozaz elemanlarının amplifikasyonu ve dizilimi, suşları I'den V'ye kadar orijinal gruplara ayırarak, orijinal gruplandırmaları doğrulandı. (Hendrix ve diğerleri, 1991).

Diğer filogenetik veya diferansiyel analizler, rpoB, icd ve com1/mucZ dahil olmak üzere spesifik genlerin dizilenmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. 8 adet *C. burnetii* izolatından rpoB dizilemesi, dörtten daha az baz farkı ortaya çıkardı, bu da onların filogenetik homojenliğini doğruladı, ancak bu izolatların dağılımı, daha önce belirlenmiş genotipleme grupları ile 16 ummas değildi. Ayrıca, com1/mucZ'ye dayalı farklılaşma, suşların coğrafi kökene göre tanımlanmadığını bulmuştur. Öte yandan, 19 *C. burnetii* izolatından icd dizilimi onları üç gruba ayırdı; burada grup I sadece akut hastalık izolatlarını içeriyordu ve grup II ve III, orijinal genotipleme gruplarıyla 16 ummas olan kronik hastalık izolatlarını içeriyordu. Ek olarak, başka bir çalışmanın sonuçları, izolatların com1 geninin sekansı kullanılarak akut ve kronik gruplara ayrılabilirliğini göstermiştir. Bu yöntemlerin ortak bir tiplendirme yöntemi geliştirememesi, *C. burnetii* izolatlarının tiplendirilmesi için hızlı ve güvenilir bir yöntemin önemli bir hedef olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bu çalışmalar ayrıca, en yaygın tiplendirme yöntemlerinin, muhtemelen karmaşık bir patojenik faktör birikiminin aracılık ettiği virülans potansiyelini ayırt etme yeteneğine sahip olmayabileceğini de göstermektedir (Zhang ve diğerleri, 1997).

## 2.7. *C. burnetii*'nin Genotipleri

Son dönem genotiplendirme analizlerinde, çok boşluklu dizi tipleme (MST) veya çoklu lokus değişken tandem tekrar sayısı analizi (MLVA) gibi teknikleri avantajlarından yararlanılmış ve tam dizili *C. burnetii* genomu oluşturulmuştur. MST, intergenik bölge dizilimine ve daha sonra 173 izolatı 30 farklı dizi tipine (MST) ayırmak için kullanılan on değişken ayırıcıyı tanımlayan *C. burnetii*'nin taranmasına dayanmaktadır (Tablo 2). Bu genotiplerin filogenetik analizi, farklı kümelere ayrılabilen üç monofiletik grubu ortaya çıkardı. Nine Mile RSA 493, Henzerling RSA 331 ve Dugway 5 J108-111'in tümü monofiletik grup I'e ayrılmıştır, oysa Priscilla MSU Q117 grup II'de ve CbuG\_Q212 grup III'te bulunmuştur (Tablo 2). Bu çalışmada com1 tiplemesi kullanıldığında, altı grup oluşturulmuş ve sadece bir izolat MST tipleme sonuçlarına uygun değildi. İlginç bir şekilde akut hastalık, Henzerling izolatını içeren ST18 ( $p = 10^{-2}$ ) ve Priscilla izolatını içeren ST8 ( $p = 10^{-3}$ ) ile ilişkili kronik hastalık (Tablo 2) dahil olmak üzere birçok MST grubuyla ilişkilendirilmiştir. Plazmit QpDV, akut hastalık izolatları ile ilişkiliydi ve QpRS, kronik hastalık izolatları ile ilişkiliydi, bu da genotip ve hastalık tipi arasında bir miktar korelasyon olduğunu gösteriyor. Ayrıca, Fransız izolatlarının çoğu monofiletik grup I'de bulunurken, diğer dizi tipleri coğrafi dağılımla 17ummas değildi. Coğrafi dağılımın bu korelasyon eksikliği, muhtemelen enfekte bireylerin, hayvanların veya çevredeki kenelerin hareketinden kaynaklanmaktadır. En ayırt edici yaklaşım olan PFGE'ye göre MST analizinin avantajı, farklı laboratuvarların sonuçlarını suşları değiştirmek zorunda kalmadan karşılaştırmasını sağlayan dizi verilerinin taşınabilirliği (Glazunova ve diğerleri, 2005).

**Tablo 2.** *C. burnetii* izolatlarının seçilmiş sekansı hakkında genotipik ve fenotipik bilgiler.

| Isolate            | Genome size | Plasmid | Source                         | Restriction group <sup>a</sup> | MST group <sup>b</sup> | MLVA group <sup>c</sup> | SNP group <sup>d</sup> |
|--------------------|-------------|---------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Nine Mile RSA 493  | 1,995,281   | pQpH1   | Tick, USA, 1935                | I                              | 16                     | E/3                     | 3                      |
| Henzerling RSA 331 | 2,016,427   | pQpH1   | Human blood, Italy, 1945       | II                             | 18                     | A                       | 8                      |
| Priscilla MSU Q177 | 2,090,565   | pQpRS   | Goat, USA, 1980                | IV                             | 8                      | F/21                    | 6                      |
| CbuG_Q212          | 2,008,870   | NP      | Human heart valve, Canada 1981 | V                              | 21                     | G/3*                    | 9                      |
| Dugway 5 J108-111  | 2,158,758   | pQpDG   | Rodent, USA, 1958              | VI                             | 20                     | I/21                    | N/A                    |

<sup>a</sup>Hendrix et al. (1991)

<sup>b</sup>Multispacer sequence typing (MST) (Glazunova et al. 2005)

<sup>c</sup>Multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) (Svraka et al. 2006; Arricau-Bouvery et al. 2006)

<sup>d</sup>Single nucleotide polymorphism (SNP) (Huijsmans et al. 2011)

\*CbuG\_Q212 was not used for analysis in these studies. But, CbuG\_Q212 does group with Scurry Q217 using MST, and predicted to group with Scurry Q217 using MLVA

MLVA, tüm bakteri türlerinde bulunan ve birçok bakteri izolatını ayırt etmek için kullanılan tekrarlayan DNA dizilerinden yararlanır. MLVA, ayırım gücü açısından PFGE ile karşılaştırılabilir; ancak bakteri suşlarının genotiplenmesi için çok daha basit bir yöntemdir. 21 *C. burnetii* izolatından dokuz MLVA tipini tanımlamak için değişken sayılı tandem tekrarları (VNTR) belirteçleri kullanıldı. Bu çalışma, MST çalışması gibi, akut ve kronik hastalık izolatları arasında fark olduğunu, S ve Priscilla izolatlarının iki farklı MLVA grubunda (sırasıyla G ve F) bulunduğu ancak aynı monofiletik grupta kümелendiğini Tablo 2’de göstermiştir (Svraka ve diğerleri, 2006). MLVA kullanılarak *C. burnetii* izolatlarının sistematik genotiplemesini değerlendiren daha yakın tarihli bir çalışma, Glazunova çalışmasının (2005) sonuçlarını doğruladı ve Nine Mile, Dugway, Scurry ve Priscilla izolatlarını aynı monofiletik gruplara ayırdı. MLVA ve MST analizinin sonuçlarının benzer olduğunu ve coğrafi izolasyon ve hastalık belirtilerine dayalı olarak suşlarda potansiyel genetik farklılıklar olduğunu düşündürdüğünü belirtmek önemlidir (Glazunova ve diğerleri, 2005; Svarka ve diğerleri, 2006). Her iki çalışma da bir 21 *C. burnetii* suş havuzunu üç monofiletik gruba ayırmış olsa da, bazı izolatların akrabalıkları kullanılan yöntemle bağlı olarak farklılık göstermiştir. Örneğin, Glazunova çalışmasında (2005) Nine Mile ve Henzerling izolatları aynı monofiletik gruba atanırken, Svarka çalışmasında (2006) bunlar farklı monofiletik gruplarda bulunmuştur. Bu iki çalışmanın sonuçları, her ikisi de coğrafi izolasyon ve hastalık tezahürüne dayalı farklılıkları desteklese de, suşların tahmin edilen ata ilişkilerinin kullanılan yöntemle bağlı olduğunu göstermektedir (MST’ye karşı MLVA). Bu nedenle epidemiyolojik raporlama için sahada kullanılan metodolojinin standardize edilmesi aydınlatıcı olacaktır (Svraka ve diğerleri, 2006; Glazunova ve diğerleri, 2005).

Son zamanlarda, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) genotiplemesi, Hollanda’daki salgından alınan klinik örneklerle doğrudan uygulanmıştır (Huijsmans ve diğerleri, 2011). Bu tekniğin duyarlılık ve hızlı analiz gibi birçok avantajı vardır. Ek olarak, farklı coğrafi bölgelerdeki *Salmonella Typhi* salgınlarında tek haplotiplerin baskın olduğunu belirlemek için SNP genotiplemesi kullanılmıştır ve bu, patojenin birbirini takip etmesinden ziyade klonal genişleme fikrini desteklemektedir (Baker ve diğerleri, 2010). Sonuç olarak, 21 adet *C. burnetii* izolatlarının SNP analizi, özellikle Hollanda’daki gibi salgın durumlarında suşların kaynağını ve yayılımını belirlemek için son derece değerli olacaktır. Sıralama verilerini kullanarak, Tablo 2.’de de gösterildiği üzere SNP analizi dokuz farklı SNP-genotipi tanımlamıştır. SNP ve MLVA genotip analizi, *C. burnetii* izolatlarını %93 uyumla benzer filogenetik gruplara ayırmıştır. SNP’nin MLVA’ya göre avantajları, pahalı sıralama ekipmanı

gerektirmemesi ve doğrudan serum örneklerine uygulanabilmesidir. Ancak, SNP'nin izolatlar arasındaki farklılıkları ayırt etme yeteneği, sırasıyla 9 ve 21 farklı filogenetik grup keşfedildiği için MLVA'dan daha az güçlüdür. Daha önce belirtildiği gibi, *C. burnetii* epidemiyolojisi alanındaki standardizasyon, dünya çapındaki dağılımı nedeniyle salgınların kaynaklarını ve atalarla olan ilişkileri doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde belirlemek için gerekli olacaktır (Huijsmans ve diğerleri, 2011; Arricau- Bouvery ve diğerleri, 2006).

*C. burnetii*'nin genetik heterojenliği bir dizi moleküler teknikle değerlendirilebilir. Esas olarak genom üzerinde seçilen lokuslar arasındaki farklılıkların tanımlanmasına dayalı olarak farklı genotipleme teknikleri mevcuttur. *C. burnetii* için yayınlanmış genotipleme teknikleri aşağıdaki tabloda mevcuttur.

**Tablo 3.** *C. burnetii* için yayınlanmış genotipleme teknikleri ve ilk yayınlandığı yıl.

| Gen İsmi  | Açıklaması                                                 | Yayın Tarihi | Kaynak                                          |
|-----------|------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------|
| RFLP      | Restriction fragment lengthpolymorphism typing             | 1990         | Jager et al. 1998; Heinzen et al. 1990          |
| Com1      | Com1 encoding genes sequencing                             | 1997         | Zhang et al. 1997                               |
| Com1/MucZ | Com1 and MucZ encoding genes sequencing                    | 1999         | Sekeyova et al. 1999                            |
| MST       | Multispacer sequence typing                                | 2005         | Glazunova et al. 2005                           |
| MLVA      | Multiple locus variable number tandem repeats analysis     | 2006         | Arricau-Bouvery et al. 2006; Svraka et al. 2006 |
| IS1111    | IS1111 repetitive element PCR based differentiation typing | 2007         | Denison et al. 2007                             |
| RAPD      | Ramdonly amplified polymorphic DNA                         | 2009         | Sidi-Boumedine et al. 2009                      |
| SNP       | Single nucleotide polymorphism typing                      | 2011         | Huijsmans et al. 2011                           |

## 2.8. Q Humması Hastalığı

Bakterinin enfektif dozu çok düşük olup bir mikroorganizma dahi enfeksiyonun oluşması için yeterlidir. *C. burnetii* bölgesel lenf nodüllerinde çoğaldıktan sonra 5-7 günlük bakteriyemi oluşturur. Etkenin hedef hücreleri monosit/makrofajlardır. Bakteri vücuda girdikten sonra makrofajlar tarafından fagosite edilmesine rağmen fagositoya karşı direnci

nedeniyle fagolizomlar içerisinde canlılığını korur ve çoğalır. Daha sonrasında ise gebe hayvnlarda meme bezlerine ve plasentaya yerleşir. Hematojen yayılım sonucunda karaciğer, dalak, kemik iliği gibi birçok organ ve dokuya yerleşmektedir. Virülens ve patojenite konusunda etkin olan yapılardan birinin bakterinin lipopolisakkarit tabakasının önemli bir faktördür (Angelakis ve Raoult, 2010).

Q humması, insanlarda esas olarak pnömoni ve hepatit gibi potansiyel komplikasyonları olan akut grip benzeri bir sendrom olarak ortaya çıkan zoonotik bir enfeksiyondur. Semptomlar düzelebilir veya kronik hale gelebilir. Kronik hastalık, nadir olmasına rağmen, en sık görülen klinik gözlem endokardit olduğundan ciddidir. İnsan enfeksiyonlarının çoğunluğu (%60) asemptomatik serokonversiyon (kanda enfeksiyon sonrası antikor görünmesi) ile sonuçlanır. Semptomların düzelmesi demek hastanın enfeksiyondan arınmış olduğunu göstermez. Hastalarda, hastalığın başlangıcından birkaç ay sonra DNA tespit edilmiştir. Enfeksiyonun sonucu hücresel immün yanıtı bağlıdır ve granülom oluşumu ile ters orantılıdır. Kronik enfeksiyon, esas olarak valvülopatili (kalp kapakçıklarının doğru açılı kapanmaması) hastalarda ve daha az ölçüde, kusurlu hücre aracılı bağışıklığı olan bağışıklığı baskılanmış hastalarda görülür (Raoult ve diğerleri, 2005).

Enfeksiyon tipik olarak kontamine toz partiküllerinde bulunan bakterinin solunmasıyla oluşur. Kaynaklar arasında çiftlik hayvanlarının barınakları, kontamine saman ve rutin olarak *C. burnetii* araştırma analizlerinin yapıldığı tesisler bulunmaktadır. Gerçekleşen bir vaka sunumunda, çiftlik hayvanlarıyla teması olmayan, *Coxiella burnetii* teşhisi yapılan ve yeni doğmuş bir kuzunun nekropsisinin yapıldığı bir bilim laboratuvarını ve nekropsi salonunu boyayan badana işçisinde duvarları boyadıktan sonra Q humması benzeri semptomlar gözlenmiş. Bu işçiden kan serumu alınmış ve antikor pozitif olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, bilmeden *C. burnetii* ile enfekte olmuş gebe koyunları taşımak için kullanılan asansörlerin yakınındaki ofislerde çalışan işçilerde dolaylı kaza sonucu maruziyetler meydana gelmiştir. Araştırma tesisleriyle ilişkili mesleki bir tehlike olarak Q hummasının, modern biyogüvenlik ekipmanı ve protokollerinin uygulanması nedeniyle büyük ölçüde ortadan kaldırıldığı belirtilmelidir (Meiklejohn ve diğerleri, 1981).

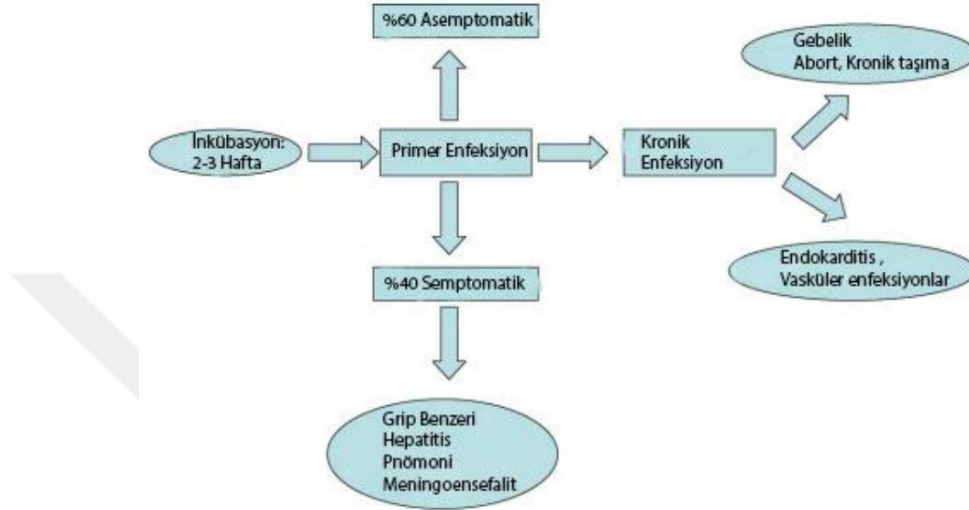
### 2.8.1. Klinik ve Laboratuvar Tanısı

Q hummasının belirti ve semptomları değişkendir ve spesifik değildir, bu da klinik tanıyı karmaşıklştırabilir ve geciktirebilir. Kuluçka süresi, kısmen enfeksiyöz doza ve konağın bağışıklık durumuna bağılı olarak birkaç günden birkaç haftaya kadar değışebilir. Akut hastalığın tipik belirtileri arasında grip benzeri bir sendrom (yani ateş, bağı ağrısı, titreme ve yorgunluk), pnömoni ve granüloamatöz hepatit bulunur. Akut hastalık, antibiyotik tedavisi olmasa bile genellikle kendi kendini sınırlar. Q hummasının insanlarda en sık ve ciddi kronik belirtisi kültür negatif endokardittir. Erken teşhis ve uygun antimikrobiyal tedavi olmadan bu hastalık ölümcül olabilir. Kan serımları pozitif olan hamile kadınların neonatal ölüm dahil olmak üzere olumsuz sonuçlara sahip olduğı bilinmektedir (Raoult ve diğeri, 2005). Akut veya subklinik hastalıktan sonra hastalık hayvanlarda persiste kalır ve etken saçılımı devam eder. Deneysel çalışmalarda gebeliğın 13. haftasında karaciğeri, dalak, böbrek, kemik iliğı, lenf nodülleri ve bağırsaklarda etken teşhis edilmektedir. Buna karşın plasenta gebelik sonlanmadan hemen önce pozitif olduğı belirlenmiştir. Abort meydana geldikten sonra doğum sıvıları ile çok yoğun bakteri saçılımı meydana gelmektedir. Aborttan sonraki dönemde IgG miktarı yükselişeri geçmektedir. İlerleyen gebeliklerde bakteri saçılımı ya hiç yoktur ya da çok az miktrada olabilir. Aborte fetüsler genel olarak normal görünümde olup Q hummasını işaret edebilecek bulguya rastlanılmaz. Buna karşın plasentada kalınlaşma, interkotiledonar kısımda kalınlaşma, akut diffuz yangı gözlenmektedir (Woldehiwet, 2004).

Asemptomatik veya akut Q humması enfeksiyonlarının %1-5'inin daha ciddi kronik Q hummasına yol açtığı tahmin edilmektedir (Angelakis ve diğeri, 2010). Bağışıklık sistemi baskılanmış bir durumu ve/veya önceden var olan kalp kapak hastalığı olan hastalarda kronik hastalık geliştirme riski daha yüksektir. Kronik Q humması, kemik iliğine göç eden ve ardından diğeri dokulara, örneğın endokardiyuma göç eden etkenlerden kaynaklanabilir (Waag, 2007).

Q hummasının spesifik olmayan doğası göz önüne alındığında, nedeni bilinmeyen bir ateşi değıerlendirirken klinik şüphesi, hastalığın doğru teşhisinde ve uygun antibiyotik tedavisinin başlatılmasında kritik öneme sahiptir. Sonraki laboratuvar doğrulaması normalde hastalarda enfeksiyondan 1-2 hafta sonra gelişeri *C. burnetii*'ye özğü antikorların varlığının test edilmesini içerir. Q humması için altın standart serolojik test, sabit tam hücre faz I ve faz II *C. burnetii* ile serum reaktivitesine dayanan dolaylı bir immünofloresan testidir (IFA).

Öncelikli olarak faz II antijenine yönelik antikorlarla, 2-3 hafta arayla alınan eşleştirilmiş numuneler arasında IgG titresinde dört kat artış, akut Q hummasının teşhisidir. Tersine, kronik Q hummasında, faz I titreleri, tanısal IgG faz I titresine 1:800 olan faz II titrelerinden daha yüksektir. (Maurin ve Raoult, 1999).



Şekil 4. Q Humması'nın doğal seyri (Angelakis E. Ve diğerleri 2010).

Real time PCR gibi teknikler kullanılarak enfeksiyöz ajanların nükleik asit bazlı tespitinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Brennan ve Samuel 2003; Waag ve Thompson 2005). Ekleme dizisi IS1111, tekrarlayan elementin birden fazla genomik kopyaya sahip olması ve böylece test duyarlılığını arttırması nedeniyle *C. burnetii*'nin PCR tespitinde tercih edilen hedeftir. Bu teknoloji artık büyük ölçüde referans ve araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. PCR tabanlı teknolojinin esas olarak erken hastalık durumunda duyarlı olduğu belirtilmektedir. Hastalık ilerledikçe, muhtemelen nötralize edici antikorlar hastanın immununda enfeksiyöz ajandan arındırdığı için test duyarlılığı azalır. Nitekim Q hummasında enfeksiyondan 17 gün sonra serumda *C. burnetii* DNA'sının saptanamaz hale geldiği bildirilmiştir (Schneeberger ve diğerleri, 2010).

Hastalığın kendisine özgü spesifik klinik belirtisinin olmaması nedeniyle teşhis için laboratuvar analizleri zorunludur. Besi yerinde üretimi zor olması, üreme için hücre kültürü ya da embriyolu tavuk yumurtası gibi in vivo ortamlara ihtiyaç duyulması etkenin izole edilmesini zahmetli, maliyetli, fazlaca iş gücü ve oldukça zaman alıcı hale getirir. İzolasyon için etkenle kontamine materyelle çalışmak içinse Biyogüvenlik Seviyesi 3 (BSL-3) olan laboratuvara ihtiyaç duyulmaktadır (OIE Terrestrial Manual Chapter 3.1.16).

## 2.8.2. Teşhis

*C. burnetii*'nin direkt teşhisinde hayvanlarda aborte fetüs parankim dokuları, mide sıvısı ile plasenta en uygun örneklerdir. Bunun yanında vaginal akıntı, süt, idrar, dışkı örneklerinden de teşhis edilmektedir (Özbey ve diğerleri, 2009). *Coxiella burnetii*, insanlardan izolasyonu veya teşhisi için kemik iliği aspiratı, kan serumu ve tam kan örneklerinin lökositlerden zengin katmanlarından teşhis edilebilmektedir. Hastalık için alınabilecek en kolay örnekler kan serumu veya tam kandır. Tam kan örneklerinin ayrıştırılması sonrasında elde edilen lökositlerden zengin tabakasından bakterinin teşhisi için iyi bir örnek olduğu bildirilmektedir (Spyridaki ve diğerleri, 1998).

### 2.8.2.1. Post mortem Muayene

Bu muayenede, *C. burnetii*'ye karşı antiserumlar kullanılarak immünohistokimyasal analiz için doku kesitleri kullanılabilir. İmmünohistokimyasal prosedürler, DAKO EnVision+System'e (DAKO Corporation, California, ABD) göre gerçekleştirilebilir (Van den Brom ve diğerleri, 2015).

### 2.8.2.2. Serolojik Muayene

*C. burnetii*'ye karşı oluşan antikorların varlığının gösterilmesi, Mikroaglutinasyon (MAT), Komplement Fiksasyon Testi (CFT), İmmünofloresan Testi (IFA) ve Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) gibi serolojik testle mümkündür. Mikroaglutinasyon ve immünofloresan tahlili şu anda daha az sıklıkla kullanılmaktadır (WOAH Terrestrial Manual Chapter 3.1.16).

ELISA'lar temel olarak IgG antikorlarını tespit etmek için yapılır. *C. burnetii* faz I ve faz II'ye karşı antikorlar, kullanılan antijene bağlı olarak ayırt edilebilir. Ticari olarak mevcut testlerin çoğu her iki antikor türünü de saptar, ancak her iki tip arasındaki oran çeşitli testler arasında farklılık gösterebilir, bu aynı zamanda antijen ekstraksiyon prosedüründen de etkilenmektedir. Bazı kurum içi veya ticari olarak temin edilebilen ELISA'lar, her iki fazdan

birine karşı oluşturulan antikorları spesifik olarak tespit etmek için kullanılabilir. Enfeksiyondan sonra, faz I antikorları, faz II antikorlarından daha uzun süre etkinlik gösterilebilir (Lang, 1988). 1980'lerden beri ELISA'lar en sık kullanılan testlerdir. İmmüno Floresan tahlili ile karşılaştırıldığında, ELISA'lar ruminantlar için %82 ila %100'lük bir duyarlılığa ve %93 ila %96'lık bir özgüllüğe sahiptir. Kompleman fiksasyon testi ve ELISA'lar, *C. burnetii*'ye karşı antikorları tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Van den Brom ve diğerleri, 2015). Bununla yanında koyun, keçi ve sığırdaki ayrı ayrı yapılan bir çalışmada, CFT'yle düşük titre pozitif tespit edilen numunelerin, ELISA testleriyle karşılaştırmalı analiz edildiğinde birkaçının negatif bir sonuç gösterdiği de bulunmuştur. Bunun IgM varlığından kaynaklandığı öne sürülmüştür. Uygulamada, ELISA'lar, seroepidemiolojik survey (sürü tarama testlerinde) çalışmalar için yaygın ve etkili kullanabilecek test yöntemi olduğu gösterilmiştir (Lang, 1988).

#### 2.8.2.3. PCR

Konvansiyonel PCR, Real Time PCR (RT-PCR), Multipleks PCR ve Nested PCR dahil olmak üzere çeşitli PCR teknikleri, farklı orijinli numunelerde *C. burnetii* DNA'sının varlığını göstermek için kullanılabilir. Çalışılacak olan örnekler arasında nekropsiden sonra hayvanlardan alınan dokular, abort materyalleri, vajinal sürüntüler, dışkı, kan serumu, süt, peynir, yoğurt, pastörize süt, toprak gibi çevrel örnekler sayılabilir. PCR testleri, bakteri genomunun farklı bölgelerini hedefleyebilir. Genel olarak, IS1111 gibi çok kopyalı genlere dayalı PCR testleri, tek kopya genlere dayalı olanlardan daha duyarlıdır. Çok kopyalı genleri kullanan Real Time PCR testleri, IS1111 elementlerinin sayısı farklı suşlar arasında 7 ila 110 arasında değişebildiğinden, numunelerdeki *C. burnetii* DNA'sının miktarını kabaca ölçebilir (Klee ve diğerleri, 2006). PCR tekniklerinin bir dezavantajı, canlı ve cansız bakteriler arasında ayırım olmamasıdır, ancak son zamanlarda *C. burnetii* için bu sorunu ortadan kaldıran bir PCR metodolojisi yayınlanmıştır. İndirect enumeration metoduyla ethidium monoazide (EMA) kullanarak qPCR'da ölü/canlı bakteri oranı verebilmişlerdir (Mori ve diğerleri, 2013).

#### 2.8.2.4. Kùltür ve Tiplendirme

Laboratuvar hayvanlarında, embriyonlu yumurtalarda ve hücre kùltüründe *C. burnetii*'nin başarılı izolasyonu ve kùltivasyonu sağlanmıştır (Dyer, 1938; Parker ve Davis, 1938). Bu teknikler günümüzde hala kullanılmaktadır. Etkenin fare gibi bir deney hayvanına enjekte edilmesi, düşük bakteri yüküne sahip numunelerden veya muhtemelen başka bakterilerle kontamine numunelerden *C. burnetii*'nin izole etmek amacıyla kullanılabilir. Bu, canlı hayvan kullanmanın bir avantajıdır. *C. burnetii*'nin optimal büyümesi için yumurta ve hücre kùltürlerinde kùltürleme tercihen antibiyotik kullanılmadan yapılmalıdır. Bakteriyel kontaminasyonu önlemek için filtreleme gereklidir, ancak bu testin hassasiyetini azaltır (Voth ve Heinzen, 2007).

Embriyonlu tavuk yumurtalarında, *C. burnetii* en iyi yumurta sarısı endoderm hücrelerinde ürer. Bu sistemin bir dezavantajı, *C. burnetii*'nin büyümesinin görsel inceleme ile izlenememesidir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, hücre kùltürü ekimlerinin birçok avantajı vardır, bu nedenle hücre kùltürü şu anda *C. burnetii*'yi izole etmek ve üretmek için en yaygın olarak kullanılan in vivo yöntemdir (Voth ve Heinzen, 2007). *C. burnetii*'nin izolasyonu ve kùltivasyonu yöntemlerinde son zamanlardaki önemli bir gelişme de host cell free mediumdur. *C. burnetii*'nin çoğaldığı asidik ortamın bileşimini taklit ederek üretmeye olanak sağlayan bir yöntemdir. Böylece deney hayvanı kullanmadan etkeni üretecek en verimli ortam sağlanmıştır. Kimyasal olarak hazırlanmış bir büyüme ortamının kullanılmasının en büyük avantajı, özellikle *C. burnetii*'nin genetik analizinde ve muhtemelen aşı üretiminin gelecekteki gelişmelerinde yardımcı olan konakçı hücre genetik materyalinin olmamasıdır (Omsland, 2012).

#### 2.8.3. Tedavi

Küçük ruminantlarda terapötik ve önleyici tedbirler, abortus oranlarını ve bakteri yayılımını azaltmayı, böylece çevresel kontaminasyonu azaltmayı amaçlamaktadır. *C. burnetii* içermeyen bir çiftliğe bir hayvan sokulduğunda, enfeksiyon bulaşmasını önlemek için özel önlemler alınmalıdır (Arricau-Bouvery ve Rodolakis, 2005). Son zamanlarda, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (2010) tarafından Q hummasının kontrolüne ilişkin ayrıntılı bir

belge hazırlanmıştır ve hastalığın etkin kontrolü için gerekli tüm adımları ve eylemleri ayrıntılı olarak açıklamaktadır.

*C. burnetii* zorunlu hücre içi etken olduğu için antibiyotiklere duyarlılığını belirlemek zordur. Ruminantlarda *C. burnetii* şüpheli abortlarda antibiyotik tedavisinin bakteri saçılma düzeyi veya süresinde hiçbir yararlı etkisi kaydedilmemiş olmasına rağmen gebeliğin son ayında iki ardışık 20 mg/kg oksitetrasiklin enjeksiyonu ile antibiyotik tedavileri önerilmiştir. (Arricau- Bouvery ve Rodolakis, 2005; Angelakis ve Raoult, 2010). Antibiyotik tedavisinin, organizmanın aynı sürüdeki etkene maruz kalmamış hayvanlara yayılmasını önleyerek koyunlarda uzun süreli bir etki ile olumlu sonuçlanacağı ileri sürmüştü de, bu hipotez sonraki çalışmalarda doğrulanamamıştır (Angelakis ve Raoult, 2010).

Yakın zamanda, *C. burnetii* enfeksiyonuna karşı insan hümmoral bağışıklık tepkisini sistematik olarak değerlendirmek için bütün proteom protein mikrodizilerini kullanan birkaç yüksek verimli yaklaşım kullanılmıştır. Bir çalışmada, 1.901 *C. burnetii* ORF'leri (tüm proteomun %84'ü) içeren bir dizi, Q-humması hasta serumları ve negatif kontrollerle incelenmiştir. On üç antijen spesifik olarak kan serumu ile yapılan çalışmada bunlardan dokuzu bir klinik laboratuvara uygulanabilen bir immüno-strip platformu kullanılarak doğrulandı (Vigil ve diğerleri, 2010). Bu çalışmalar, rekombinant proteine dayalı yeni nesil tanı ve aşı antijenlerinin geliştirilmesi için gerekli bilgileri sağlamaktadır.

Akut enfeksiyonların çoğu kendiliğinden düzelse de, antibiyotik tedavisi semptomatik hastalık süresini ve kronik enfeksiyon olasılığını önemli ölçüde azaltır. Akut Q humması için önerilen mevcut tedavi 14 günlük doksisisiklin (200 mg/gün) kürüdür. Rifampin ve florokinolon antibiyotikler alternatif tedavilerdir. Hamileler için trimetoprim ve sülfametoksazol kombinasyonu tedavisi önerilir. Kronik Q humması için yetişkinler, en az 18 ay boyunca sırasıyla günde 200 ve 600 mg doksisisiklin ve hidroksiklorokin ile tedavi edilir. Hidroksiklorokin, asidik fagolizozomu alkalize eder, böylece doksisisiklin aktivitesini güçlendirir (Angelakis ve Raoult, 2010).

#### **2.8.4. Korunma**

*C. burnetii* ile enfekte olmuş çiftliklerden alınan sütün pastörize edilmesi, insanlarda oral enfeksiyonu önlemek için tavsiye edilir, ancak bu yol insanlar için önemli bir enfeksiyon yolu değildir (Arricau-Bouvery ve Rodolakis, 2005).

Çiftliklerdeki uyulması gereken biyogüvenlik ve genel hijyen önlemleri, insanların *C. burnetii*'ye maruz kalma riskini azaltır. Doğum sırasında oluşacak saçılmalar ana bulaşma kaynağı olduğundan hastalıklı çiftliklerde yavrulama sıkı hijyen koşulları altında gerçekleştirilmelidir. Atık yapan hayvanın plasenta ve fetüsü uygun şekilde toplanıp ve imha edilmelidir. Çiftçiler veya Veteriner Hekimler gibi mesleki olarak etkene maruz kalabilecek kişiler kişisel koruyucu ekipmanlarını giymelidir. Enfekte çiftlikteki gübreler tarlalarda kullanılacaksa uygun şekilde ısıtılmalı ve tutulup kompostlanmalıdır. Gübreden aerosol bulaş riskini azaltmak için diğer seçenek ise gübrenin kireç veya %0,4'lük kalsiyum siyanür ile işlenmesidir (Arricau-Bouvery ve diğerleri, 2001). Enfekte çiftliklerden gelen gübrenin tarlalara yayılması rüzgarlı koşullarda gerçekleşmemelidir (Arricau-Bouvery ve Rodolakis, 2005). Belirli durumlarda, uygun kene ve helmint kontrol önlemleri ile çevresel kontaminasyonun daha da azaltılması sağlanabilir. Hamile kadınlar, küçük çocuklar, yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış kişiler pastörize edilmemiş ürünleri ile herhangi bir temastan kaçınılmalıdır (Angelakis ve Raoult, 2010).

İlaç kullanımı ile kontrol altına alınamayan bu önemli zoonoz konusunda sanitasyon önlemleri önem kazanmaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı Hayvan Hastalıklarıyla Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrol Genelgesi 2017). Bunlar;

- Ölü yavru ve her türlü kontamine altlık, malzeme, plasenta vs gibi risk taşıyan materyalin hızla uzaklaştırılması ve imha edilmesi
- Kontamine materyalin asla hayvan yemi vb olarak kullanılmaması
- Enfeksiyonun görüldüğü işletmelerde, sıkı dezenfeksiyon yapılması
- Abort yapan hayvanın işletme içinde serbest dolaşımı engellenmeli
- Özellikle doğum yapacak hayvanların bulunduğu bölümde hijyenik önlemlerin alınması
- Ayrılmış doğum bölgesi kullanılması
- Enfeksiyonun taşınmasında önemli rol oynayan kenelerle aktif mücadele
- Özellikle doğumuna 2- 3 hafta kalmış hayvanların hareketlerinin sınırlandırılması olarak belirtilmiştir.

#### 2.8.4.1. Aşılar

Avustralya’da Q-Vax adlı bir Q humması aşısı üretilmiş ve kullanım için lisanslanmıştır. Henzerling faz I suşunun formalinle inaktive edilmiş tam hücreli *C. burnetii*’sinden oluşur. Aşı, en az 5 yıl süren koruma ile %98 etkili olarak kabul edilir. Daha önce *C. burnetii* ile enfekte olmuş bağışıklı bireylerde sırasıyla sertleşme ve titreme gibi olumsuz lokal ve sistemik reaksiyonlar meydana gelebilir. Bu nedenle seroloji ve deri testleri yapılır. Aşılamadan önce bağışıklık durumunu değerlendirmek için. Q humması önleyiciler için önemli bir hedef, aşılama öncesi cilt testi gerektirmeyen güvenli ve etkili bir aşının geliştirilmesidir. Bu karşı önlem, özellikle duyarlı bir popülasyonun hızla aşılmasının gerekeceği kasıtlı bir *C. burnetii* salınımı durumunda geçerlidir. Akselik (konak hücresiz) kültürdeki son gelişmeler ve *C. burnetii*’nin genetik manipülasyonu böyle bir aşının geliştirilmesini kolaylaştırmalıdır (Omsland ve diğerleri, 2009; Beare ve diğerleri, 2011).

*C. burnetii* ile ilgili araştırmaların hızı son on yılda önemli ölçüde artmasına rağmen, birçok soru cevapsız kaldı. Patojen oldukça bulaşıcıdır ve bir makrofaj konakçı hücrenin misafirperver olmayan fagolizozomunu kolonize edebilir. Bununla birlikte, başarılı konak hücre parazitizmi ve hastalık patogenezi sağlayan virülans faktörleri büyük ölçüde bilinmemektedir. Aslında, bugüne kadar LPS hala *C. burnetii*’nin doğrulanmış tek virülans faktörüdür, bir kobay Q humması modelinde izojenik mutantların test edilmesinden kaynaklanan bir bulgudur. Yeni genetik araçlar, olası *C. burnetii* virülans genleri için moleküler Koch’un varsayımlarının yerine getirilmesine yakında izin vermelidir. Q humması hastalığı patogenezi muhtemelen çok faktörlüdür ve bir faktör diğerinin üzerine kuruludur ve klinik hastalığa yol açan bir dizi patolojik saldırı yaratır. Koruyucu bağışıklığın bağışıklık bağıntılarını daha iyi anlamak için Q humması sırasında meydana gelen bağışıklık modülasyonunu daha fazla araştırmak önemlidir, bu bilgiler minimum yan etkilere sahip etkili bir aşının geliştirilmesi için önemlidir (Brom ve diğerleri, 2015).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

Tez çalışmasında 2017-2019 yılları arasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü çalışma sorumluluk alanı içerisindeki İstanbul, Edirne, Kocaeli, Bursa, Balıkesir, Çanakkale, Kırklareli, Tekirdağ, Yalova, Düzce, Sakarya ve Bilecik illerinden toplanan 32 sığır, 4 manda, 64 koyun, 8 keçi olmak üzere toplam 108 adet evcil ruminantlara ait aborte fetüs ve plasental örnekleri materyali oluşturmaktadır. Numune seçiminde abort materyalinin bütün halde fetüs ve plaseenta olmasına dikkat edildi. Real time PCR analizinde ADN Cb NM/2017 09 P6 kodlu *Coxiella burnetii* Nine Mile suşu DNA örneği pozitif kontrol olarak kullanıldı.

##### 3.1.1. Numunelerin Seçimi ve Hazırlanması

Fötal dokuların ve plasentanın nükleik asit izolasyonu öncesinde homojenizasyonu için steril havanlarda nekropsisi yapılan fetüslerin iç organları (akciğer, karaciğer, böbrek, dalak, mide içeriği) ve plasentalarını homojenat haline getirildi. Sonrasında QIAamp cador Pathogen kit (ticari marka) dokuların enzimatik digesyon metoduna göre gerçekleştirildi. Bu aşamada steril mikrosantrifüj tüpü, proteinaz K, ATL buffer (Qiagen cat no: 54104) kimyasalları ile benmari, vorteks ve santrifüj cihazları kullanıldı.

##### 3.1.2. DNA Ekstraksiyonu

Tez çalışmasında fötal doku örneklerinden DNA izolasyonu için QIAamp cador Pathogen kit ticari nükleik asit izolasyon kiti kullanıldı. Kit içeriği Tablo 4'te verildi. Ekstraksiyon sonrası izolasyonun performansını ölçmek için Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre (Nano Drop Test) Thermo Scientific NanoDrop 2000 cihazı kullanıldı.

### 3.1.3. Nested PCR Analizi

Fötal dokulardan elde edilen nükleik asit örneklerinde *C. burnetii* DNA'sının tespiti için Nested PCR gerçekleştirilerek jel elektroforez ile analiz değerlendirildi. Analizde kullanılan materyaller ve primer dizileri Tablo 5'te gösterildi. PCR analizinde kullanılan primer dizleri Tablo 6'da gösterildi.

**Tablo 4.** DNA izolasyonu için kullanılan nükleik asit izolasyon kit içeriği.

| Reagent             | Miktar   |
|---------------------|----------|
| ACB Buffer          | 60 ml    |
| VXL Buffer          | 30 ml    |
| AW1 Buffer          | 98 ml    |
| AW2 Buffer          | 66 ml    |
| Proteinaz K         | 6 ml     |
| AVE                 | 2x20 ml  |
| Spin Kolon          | 250 adet |
| Mikrosantrifüj Tüpü | 250 adet |

**Tablo 5.** Kullanılan cihazlar ve kimyasallar.

| Kimyasal Sarf ve Cihaz      | Açıklama                                                       |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Trans1 Primer               | Letgen, 10 pmol                                                |
| Trans2 Primer               | Letgen, 10 pmol                                                |
| Trans3 Primer               | Letgen,10 pmol                                                 |
| Trans4 Primer               | Letgen,10 pmol                                                 |
| HotStart PCR Master karışım | Qiagen, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, Buffer içeren Master karışım |
| Ultra Saf Su                | Qiagen                                                         |

|                                    |                                 |
|------------------------------------|---------------------------------|
| Agaroz                             | Sigma                           |
| Etidyum Bromid                     | Sigma                           |
| Loading Dye                        | Thermo, 6X                      |
| Ladder                             | Thermo, 100 bp                  |
| Tris Asetik Asit Edta (TAE) Buffer | Biological Industries           |
| Ethanol                            | Sigma                           |
| İsopropanol                        | Sigma                           |
| Fosfat Tamponlu Solüsyon           | Sigma                           |
| Thermal Cycler                     | Techne TC-412                   |
| Benmari                            | Memmert                         |
| Vorteks                            | Velp Scientifica                |
| Santrifüj                          | Hettich 200R                    |
| Hassas Terazi                      | Shimadzu                        |
| Transilluminatör                   | Hommer                          |
| Elektroforez Tankı ve Power Supply | Thermo Fisher                   |
| Mikrodalga Fırın                   | Vestel                          |
| Çeker Ocaklı Kabin                 | Yerli Sanayii Üretimi           |
| Nano Drop Test                     | Thermo Scientific NanoDrop 2000 |
| Biyogüvenlik Kabini                | Healtorce HF Save – 1200        |
| İnübatör                           | MMM Incucell                    |
| Kuru Blok Isıtıcı                  | Genius                          |

**Tablo 6.** Kullanılan Primer dizileri.

| <b>Primer ve Problar</b> | <b>5'-3' Dizilim</b>        |
|--------------------------|-----------------------------|
| Trans1 Primer            | TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT |

|               |                             |
|---------------|-----------------------------|
| Trans2 Primer | CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC |
| Trans3 Primer | GTA ACG ATG CGC AGG CGA T   |
| Trans4 Primer | CCC CCG CTT CGC TCG CTA     |

### 3.1.4. Real Time PCR Analizi

Fötal dokulardan elde edilen nükleik asit örneklerinde *C. burnetii* DNA'sının tespiti için real time PCR gerçekleştirildi. Analizde kullanılan materyaller ve primer-prob dizileri Tablo 7 ve Tablo 8'de gösterildi.

**Tablo 7.** Real Time PCR'da kullanılan primer ve mastermix setleri, cihazlar.

| Kimyasal Sarf ve Cihaz    | Açıklama                 |
|---------------------------|--------------------------|
| Forward Primer            | Letgen, 10 pmol          |
| Reverse Primer            | Letgen,10 pmol           |
| Probe                     | Letgen, 4 pmol           |
| LightCycler Taqman Master | Roche                    |
| Ultra Saf Su              | Roche                    |
| Real Time Cihazı          | HiMedia Insta q96        |
| Biyogüvenlik Kabini       | Healtorce HF Save – 1200 |

**Tablo 8.** Real Time PCR'da kullanılan primer dizileri.

| Primer ve Problar | 5'-3' Dizilim                           |
|-------------------|-----------------------------------------|
| Forward Primer    | GTCTTAAGGTGGGCTGCGTG                    |
| Reverse Primer    | CCCCGAATCTCATTGATCAGC                   |
| Prob              | FAM-AGCGAACCATTGGTATCGGACGTTTAMRA-TATGG |

### 3.1.5. MLVA Analizi

Sunulan tez araştırmasında PCR yöntemleriyle tespit edilen *C. burnetii* pozitif örneklerde suşların genotiplendirilmesinde MLVA metodu kullanıldı. MLVA’da kullanılan materyal ve cihazlar Tablo 9’de, örneklerin kromozomal DNA’larında belirlenen tekrar eden lokuslar Tablo 10’da verildi. *C. burnetii* örneklerinin kromozomal DNA’larında belirlenen lokuslardaki tekrar eden gen bölgelerinin analizi için ABI 3130 XL kapiller elektroforez cihazı kullanıldı.

**Tablo 9.** MLVA analizinde kullanılan materyal ve cihazlar.

| Kimyasal Sarf ve Cihaz            | Açıklama                                                       |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ms23_7bp_133bp_9U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms24_7bp_261bp_27U Primer         | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms27_6bp_89bp_4U Primer           | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms28_6bp_111bp_6U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms33_7bp_104bp_9U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms34_6bp_101bp_5U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms23_7bp_133bp_9U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms24_7bp_261bp_27U Primer         | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms27_6bp_89bp_4U Primer           | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms28_6bp_111bp_6U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms33_7bp_104bp_9U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| ms34_6bp_101bp_5U Primer          | Microsynth, 10 pmol                                            |
| HotStart PCR Master karışım       | Qiagen, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, Buffer içeren Master karışım |
| Ultra Saf Su                      | Qiagen                                                         |
| Thermal Cycler                    | Techne TC-412                                                  |
| ABI 3130 XL Kapiller Elektroforez | Applied Biosystems                                             |

**Tablo 10.** Örneklerin kromozomal DNA'larında belirlenen tekrar eden lokuslar.

| Primer Adı         | Forward (5' – 3')          | Reverse (5' – 3')        |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|
| ms23_7bp_133bp_9U  | HEX-CGCMTAGCGACACAACCAC    | GACGGGCTAAATTACACCTGCT   |
| ms24_7bp_261bp_27U | FAM-TGGAGGGACTCCGATTAAAA   | GCCACACAACCTCTGTTTTTCAG  |
| ms27_6bp_89bp_4U   | HEX-TCCTTTATTTTCAGGCCGGAGT | GAACGACTCATTGAACACACG    |
| ms28_6bp_111bp_6U  | NED-AGCAAAGAAATGTGAGGATCG  | GCCAAAGGGATATTTTTGTCCTTC |
| ms33_7bp_104bp_9U  | NED_TCGCGTAGCGACACAACC     | GTAGCCCGTATGACGCGAAC     |
| ms34_6bp_101bp_5U  | FAM-TTCTTCGGTGAGTTGCTGTG   | GCAATGACTATCAGCGACTCGAA  |

### 3.2. Yöntem

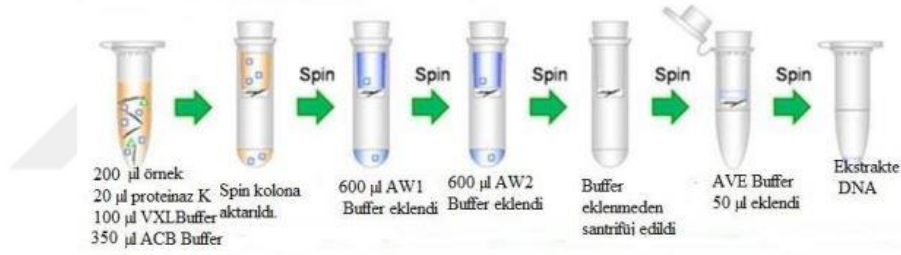
#### 3.2.1. Numunelerin Hazırlanması

Araştırmada Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü faaliyet ve sorumluluk alanı içerisindeki 12 ilden Q humması analizi için toplanan sığır, manda, koyun ve keçi fetüs ve plasenta örneklerinden toplam 108 numune çalışmaya dahil edildi. Fetüs örnekleri uygun şekilde nekropsisi yapılarak karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, mide içeriği ve plasenta doku örnekleri steril havan içerisine alınarak homojen hale getirildi. Hazırlanan homojenattan 25 mg ve 0,5 ml abomazum içeriği 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüp üzerine 1 ml fosfat tamponlu solüsyonu (PBS) eklendi. Tüp içerisine 180 µl ATL buffer ve 20 µl proteinaz K eklendi. Hazırlanan tüpler 56°C'de benmaride 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler 10 saniye vortekslendikten sonra 5.000 rpm devirde 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatanttan 200 µl alınarak nükleik asit izolasyonu için 2 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

#### 3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Nükleik asit izolasyonunda QIAamp cador Pathogen kit kullanıldı. Ekstraksiyon kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Fötal doku örneklerinden alınan 200 µl homojenatın üzerine 20 µl proteinaz K ve 200 µl VXL buffer eklendi ve 10 saniye vortekslenerek homojen hale getirildi. Homojenize edilen numuneler 24±2°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüp içerisine 350 µl ACB buffer aktarıldı. Karışım 10 saniye vortekslenerek homojen hale getirildi. Homojenize edildikten sonra tüp içeriğinin

tamamı kit içerisinde bulunan spin kolon üzerine aktarıldı ve 8.000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun atık tüpü değiştirilerek alt kısım uzaklaştırıldı. Spin kolon üzerine 600 µl AW1 buffer eklendi ve 8.000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun atık tüpü değiştirilerek alt kısım uzaklaştırıldı. Spin kolon üzerine 600 µl AW2 buffer eklendi ve 8.000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun atık tüpü değiştirilerek alt kısım uzaklaştırıldı. Spin kolon üzerine herhangi bir kimyasal ekleme yapılmadan 14.000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun atık tüpü değiştirilerek alt kısım uzaklaştırıldı. Spin kolon üzerine 50 µl AVE buffer eklendi ve 24±2°C’de 1 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonra 14.000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen DNA örneklerinin performanslarının ölçülmesi için Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre (Nano Drop Test) Thermo Scientific NanoDrop 2000 cihazıyla ölçümleri alındı. Nested PCR, real time PCR ve MLVA analizleri gerçekleştirilinceye kadar -20°C’de muhafaza edildi.



Şekil 5. Spin kolon metoduyla DNA izolasyonu.

### 3.2.3. Real Time PCR Analizi

Fötal doku ve plasenta numunelerinde *C. burnetii* varlığının araştırılmasında ilk olarak real time PCR analizi gerçekleştirildi. Toplam 108 adet aborte fötal numunenin real time PCR analizinde IS1111 gen bölgesini hedef alan primer-prob dizaynına sahip Klee ve ark. (2006) metodu referans alınarak analiz gerçekleştirildi.

Reaksiyon toplam hacmi 25 µl olacak şekilde; 7,5 µl nükleaz ari H<sub>2</sub>O, 1 µl forward primer (10µM), 1 µl reverse primer (10µM) üzerine 10 µl FastStart master miks, 0.5 µl Taqman probe (4µM) ve 5µl kalıp DNA bileşenlerinden oluşturuldu. PCR amplifikasyonu, Real time PCR cihazında (HiMedia Insta Q96) gerçekleştirildi. Termal döngü, 95°C’de 10 dakika denatürasyon ve 95°C’de 3 saniye, 60°C’de 30 saniye ve 72°C’de 1 saniye olacak şekilde 45 döngüden oluşan amplifikasyon aşamasından oluşturuldu. Amplifikasyon

sonrasında eşik değeri (tresholt cycle: CT) değeri 34 ve aşağısındaki örnekler pozitif olarak kabul edildi. ADN Cb NM/2017 09 P6 kodlu *Coxiella burnetii* Nine Mile suşu DNA'sı pozitif kontrol, ultra saf (FastStart master mix içeriği) su ise negatif kontrol olarak numuneler ile birlikte analiz edildi.

### 3.2.4. Nested PCR Analizi

Real time PCR analizi sonrasında pozitif olarak belirlenen numuneler *Coxiella burnetii* varlığının araştırılmasında *IS1111* gen bölgesini hedef alan Cumbassá ve ark. (2015) metoduna uygun şekilde nested PCR analizi gerçekleştirildi. Her analizde 1 adet pozitif kontrol, 1 adet negatif kontrol analize dahil edildi.

İlk PCR analizinde Trans1 ve Trans2 primerleri kullanılarak 687 bp'lik gen bölgesi amplifiye edildi. Reaksiyon 0,2 ml hacimli reaksiyon tüplerinde hazırlandı. Reaksiyon için kullanıma hazır Qiagen hotstart master mix kiti protokolüne göre gerçekleştirildi. Reaksiyon toplam hacmi 25 µl olacak şekilde; 12,5 µl hotstart master mix, 2,5 µl numune DNA örneği, 1 µl Trans1 primer (10 mikromolar), 1 µl Trans2 primer (10 mikromolar), 8 µl ultra saf su eklenerek hazırlandı. PCR ısı döngüleri touchdown metoduna göre gerçekleştirildi. İlk denaturasyon 95°C'de 15 dakika, 94°C'de 30 saniye, her döngüde 1°C düşürülecek şekilde 66°C'den 61°C'ye 1 dakika düşürüldü, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde ilk 6 döngü gerçekleştirildi. Sonrasında 94°C'de 30 saniye, 61°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde 35 döngü gerçekleştirildi. Son uzama için 72°C'de 5 dakika ısı işlem gerçekleştirildi. PCR analizi sonucunda amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği jel elektroforezi ile belirlendi.

Birinci PCR analizinde (Trans1 ve Trans2 amplikasyonu) 687 bp'de elde edilen amplikonlardan ikinci basamak Trans3, Trans4 primerleri ile ikincil PCR gerçekleştirilerek 243 bp boyutunda amplifikasyon için analiz edildi.

Reaksiyon 0,2 ml hacimli reaksiyon tüplerinde hazırlandı. Reaksiyon için kullanıma hazır Qiagen hotstart master mix kiti protokolüne göre gerçekleştirildi. Reaksiyon toplam hacmi 25 µl olacak şekilde; 12,5 µl hotstart master mix, birinci PCR test amplikonundan 2,5 µl, 1 µl Trans3 primer (10 mikromolar), 1 µl Trans4 primer (10 mikromolar), 8 µl ultra saf su eklenerek hazırlandı. PCR ısı döngüleri touchdown metoduna göre gerçekleştirildi. İlk denaturasyon 95°C'de 15 dakika, sonrasında 94°C'de 30 saniye, 61°C'de 30 saniye, 72°C'de

1 dakika olacak şekilde 40 döngü gerçekleştirildi. Son uzama için 72°C’de 5 dakika ısıtım işlemi gerçekleştirildi. ADN Cb NM/2017 09 P6 kodlu *Coxiella burnetii* Nine Mile suşu DNA’sı pozitif kontrol, ultra saf su ise negatif kontrol olarak numuneler ile birlikte analiz edildi.

### 3.2.5. Jel Elektroforez

Agaroz jelde elektroforez işleminde %1,5 oranındaki agaroz kullanıldı. Jel, 30 ml 1X TAE buffer solüsyonu bulunan beher içerisinde 0,45 g agaroz eklendi ve mikrodalga fırınında (Beko marka) agaroz tamamen homojen hale gelinceye kadar ısıtım işlemi uygulandı. Homojen hale gelen agaroz içerisine 1 µl etidyum bromid eklendi. Agaroz jel tankına tek seferde aktarıldı ve kuyucukların oluşması için 20 gözlü tarak aparatı tanka eklenerek agaroz donuncaya kadar oda sıcaklığında çeker ocak içerisinde bekletilerek hazırlandı.

Nested PCR’da birinci PCR analizinde elde edilen ara ürünlerin varlığı ve testin çalıştığının konfirmasyonu amacıyla ve ikinci PCR sonrasında elde edilen amplikonlarda pozitiflik ve negatifliğin değerlendirilmesinde %1,5 oranında hazırlanmış olan agaroz jelde elektroforez işlemi yürütüldü. Her PCR tüpünden 5 µl PCR ürünü, 1 µl DNA loading dye parafin film üzerinde mikropipet ile karıştırıldıktan sonra tüm hacim jelde belirlenen kuyucuğa aktarıldı. Her yürütmeye numuneler haricinde 20 adet kuyucuk içerisinde 1 adet pozitif kontrol, 1 adet negatif kontrol ve 2 adet 100-1000 bp DNA ladder kullanıldı. Birinci PCR analizinde pozitif kontrol kuyucuğunda 687 bp’de bant gözlenmesi, negatif kontrol kuyucuğunda herhangi bir bant görülmemesi durumu testin ilk aşamasının geçerli olduğunu gösterdi. Daha sonrasında ikinci PCR reaksiyonu sonucunda pozitif kontrol ve real time PCR’da *C. burnetii* pozitif tespit edilmiş numunelerin yüklendiği kuyucuklarında 243 bp’de bant görülmesi pozitif olarak kabul edildi.

### 3.2.6. MLVA

Real Time PCR ve Nested PCR analizlerinde pozitif olarak tespit edilen DNA örneklerinde bulunan *C. burnetii*’nin genotipik varyasyonlarının belirlenmesinde MS23, MS24, MS27, MS28, MS33 ve MS34 olmak üzere 6 lokustaki analizi için Klaassen ve diğerleri, (2009) ve Tilburg ve diğerleri, (2012) metodlarına uygun olarak MLVA analizi

yürütüldü. Reaksiyonlar 20 µl hacminde olacak şekilde, 10 µl HotStartTaq Master Mix (Qiagen), 6 µl deiyonize distile su, 0,5 µM primer, 2 µl örnek DNA olacak şekilde 0,2 ml'lik tüpler içerisinde hazırlandıktan sonra thermal cyclerde 95°C'de 15 dakika ilk denaturasyon sonrasında, 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 45 saniye ve 72 °C'de 90 saniye olacak şekilde 40 döngü yapıldı. Son uzama evresi için 72°C'de 7 dakika uygulandı. Elde edilen PCR ürünlerinin analizleri için ABI 3130 XL kapiller elektroforez cihazında yürütme yapıldı. Yürütme esnasında uygun floresan ile işaretli primerlerin bağlı olduğu PCR ürünlerinin baz boyutları pik olarak alındı. Elde edilen ürün boyut değerleri lokusta tekrar eden baz sayısı ve ürün boyutuna göre değerlendirilerek her bir pozitif örnekteki her lokusta tekrar sayıları belirlenerek suşa özgü MLVA profili oluşturuldu.

Oluşan MLVA profilleri Past programı kullanılarak, Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) yöntemi ve şuşlar arasındaki ilişki tekrarlaraya dayalı “Dice” benzerlik katsayısına göre değerlendirildi (Aslan ve Nağıyev 2015). Benzerlik katsayısı % 95 olan şuşlar tek genotip olarak kabul edildi. Past yazılımından alınan nexus dosyaları iTOL programına aktarılarak dendrogram oluşturuldu.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İllere göre numune ve hayvan türleri

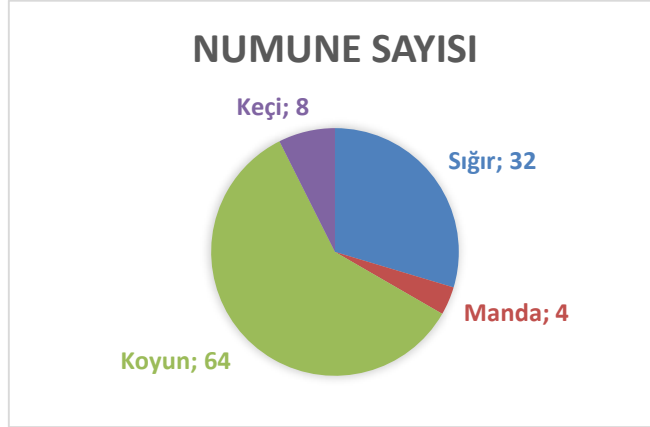
Sunulan tez çalışmasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü çalışma ve sorumluluk alanı içerisinde bulunan İstanbul, Edirne, Kocaeli, Bursa, Balıkesir, Çanakkale, Kırklareli, Tekirdağ, Yalova, Düzce, Sakarya ve Bilecik illerinden alınan toplam 108 adet aborte fetüs ve plasenta örneklerinde *C. burnetii* varlığı araştırıldı. İncelemeye alınan numunelerin illere göre dağılımı Tablo 11’de gösterildi. Sığır fotal örneklerinin en yüksek sayıda alındığı iller Balıkesir ve Edirne illeri olup iki ilden alınan numune sayısı toplam sığır fotal numune sayısının yaklaşık 1/3’ü kadar olduğu belirlendi. Araştırmada en yüksek sayıda koyun fotal örnekleri alınan iller; Tekirdağ (%17) ve Balıkesir (%15) illeridir. Keçi fetüs ve plasenta örnekleri yalnızca Çanakkale (%37,5), Kırklareli (%37,5) ve Edirne (%25) olmak üzere 3 ilden alındı. Manda örnekleri ise yalnızca İstanbul’dan alındı.

**Tablo 11.** *C. burnetii* analizi için alınan numunelerin illere göre dağılımları.

| İl         | Sığır | Koyun | Keçi | Manda | Toplam |
|------------|-------|-------|------|-------|--------|
| İstanbul   | 3     | 4     | 0    | 4     | 11     |
| Edirne     | 5     | 8     | 2    | 0     | 15     |
| Kocaeli    | 3     | 6     | 0    | 0     | 9      |
| Bursa      | 4     | 8     | 0    | 0     | 12     |
| Balıkesir  | 5     | 10    | 0    | 0     | 15     |
| Çanakkale  | 2     | 5     | 3    | 0     | 10     |
| Kırklareli | 3     | 9     | 3    | 0     | 15     |
| Tekirdağ   | 2     | 11    | 0    | 0     | 13     |
| Yalova     | 1     | 1     | 0    | 0     | 2      |
| Düzce      | 2     | 1     | 0    | 0     | 3      |
| Sakarya    | 1     | 1     | 0    | 0     | 2      |
| Bilecik    | 1     | 0     | 0    | 0     | 1      |
| TOPLAM     | 32    | 64    | 8    | 4     | 108    |

Sunulan tez çalışmasında toplam 108 adet aborte fetüs ve plasenta örneği analiz edildi. Hayvan türlerine göre incelenen numune sayılarının dağılımları Şekil 5 ile gösterildi. Numunelerin alındığı hayvan türleri incelendiğinde koyun örnekleri tüm incelenen

numunelerinin %59,2 (64/108)'unu oluşturdu. Sığır numuneleri %29,6 (32/108), keçi numuneleri %7,4 (8/108) ve manda numuneleri %3,7 (4/108) oranında olduğu belirlendi.



şekil 6. Numune sayılarının hayvan türlerine göre dağılımı.

#### 4.2. Real time PCR bulguları

Toplam 108 adet evcil ruminanta ait aborte fetüs ve plasenta örneklerinin real time PCR analizleri gerçekleştirildi. Real time PCR analizinde eşik değeri (threshold cycle; CT) 34 ve altındaki pikler pozitif olarak değeriendirildi. Analiz sonucunda numunelerin % 16,7 (18/108) numunede *C. burnetii*'ye spesifik DNA tespit edildi. Analiz sonucunda tespit edilen pozitiflikler ile hayvan türlerine göre dağılım Tablo 12'de gösterildi. Keçilerden alınan numunelerdeki pozitiflik diğer hayvan türlerine nazaran %25,0 oranındaki pozitiflik ile en yüksek pozitiflik tespit edilmiş olup pozitiflik büyüklüğüne göre sırasıyla koyunlarda %20,3, sığırlarda %9,4 olarak tespit edildi. Mandalarda herhangi bir pozitiflik belirlenmedi.

**Tablo 12.** Hayvan türlerine göre pozitif ve negatif kayıtların yüzde dağılımı.

| Hayvan Türü | Toplam Numune | Negatif Numune | Pozitif Numune | Yüzde Pozitif |
|-------------|---------------|----------------|----------------|---------------|
| Sığır       | 32            | 29             | 3              | 9,4           |
| Manda       | 4             | 4              | 0              | 0             |
| Koyun       | 64            | 51             | 13             | 20,3          |
| Keęi        | 8             | 6              | 2              | 25,0          |
| Toplam      | 108           | 90             | 18             | 16,7          |

Örnek alınan illerdeki Q humması pozitifliği ele alındığında tespit edilen pozitiflik sayısının illere göre dağılımları Tablo 13’de gösterildi. *C. burnetii* tespit edilen iller arasında %33,3 Kırklareli’den alınan numunelerde en yüksek oranda pozitiflik belirlendi. İstanbul, Kocaeli, Yalova, Düzce, Sakarya ve Bilecik illerinden alınan numunelerde herhangi bir pozitiflik tespit edilmedi.

**Tablo 13.** İllere türlerine göre pozitif ve negatif kayıtların yüzde dağılımı.

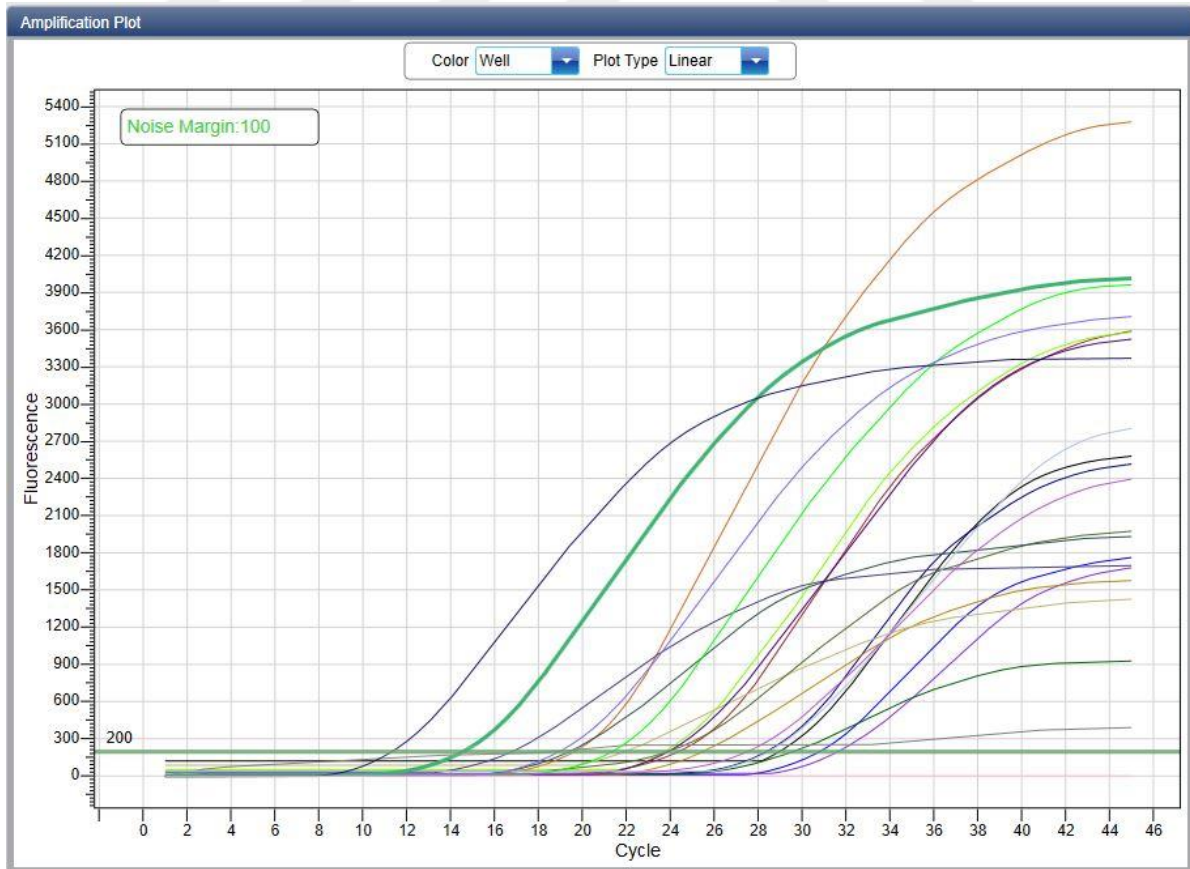
| İl         | Toplam Numune | Negatif Numune | Pozitif Numune | Yüzde Pozitif |
|------------|---------------|----------------|----------------|---------------|
| İstanbul   | 11            | 11             | 0              | 0             |
| Edirne     | 15            | 12             | 3              | 20,0          |
| Kocaeli    | 9             | 9              | 0              | 0             |
| Bursa      | 12            | 11             | 1              | 8,3           |
| Balıkesir  | 15            | 11             | 4              | 26,7          |
| Çanakkale  | 10            | 8              | 2              | 20,0          |
| Kırklareli | 15            | 10             | 5              | 33,3          |
| Tekirdağ   | 13            | 10             | 3              | 23,1          |
| Yalova     | 2             | 2              | 0              | 0             |
| Düzce      | 3             | 3              | 0              | 0             |
| Sakarya    | 2             | 2              | 0              | 0             |
| Bilecik    | 1             | 1              | 0              | 0             |
| Toplam     | 108           | 90             | 18             | 16,7          |

Real time PCR analizleri sonucunda örneklerin CT değerleri 14,69 ile 30,05 arasında olduğu tespit edildi. Numunelerin CT değerleri ve NanoDrop Test Sonuçları Tablo 14’de gösterildi. Real Time analiz sonuçlarına ait grafik Şekil 7’te verildi.

**Tablo 14.** Numunelerin CT değerleri ve NanoDrop test sonuçları.

| Numune kodu | Numune numarası | İl        | Hayvan Türü | CT    | 260/280 NanoDrop | 260/230 NanoDrop |
|-------------|-----------------|-----------|-------------|-------|------------------|------------------|
| Cbu 1       | 19              | Balıkesir | Sığır       | 16,91 | 1,85             | 2,38             |
| Cbu 2       | 57              | Bursa     | Sığır       | 30,05 | 1,63             | 1,26             |
| Cbu 3       | 85              | Edirne    | Sığır       | 23,84 | 1,94             | 2,10             |

|                 |     |            |       |       |      |      |
|-----------------|-----|------------|-------|-------|------|------|
| Cbu 4           | 52  | Balıkesir  | Koyun | 19,76 | 1,83 | 2,05 |
| Cbu 5           | 17  | Balıkesir  | Koyun | 28,5  | 1,89 | 2,06 |
| Cbu 6           | 71  | Balıkesir  | Koyun | 25,6  | 1,78 | 2,11 |
| Cbu 7           | 24  | Çanakkale  | Koyun | 22,04 | 1,63 | 2,03 |
| Cbu 8           | 98  | Edirne     | Koyun | 24,00 | 1,96 | 2,00 |
| Cbu 9           | 27  | Edirne     | Koyun | 29,05 | 1,55 | 0,90 |
| Cbu 10          | 31  | Kırklareli | Koyun | 19,54 | 1,92 | 1,63 |
| Cbu 11          | 18  | Kırklareli | Koyun | 21,31 | 2,01 | 1,35 |
| Cbu 12          | 47  | Kırklareli | Koyun | 24,51 | 2,00 | 1,98 |
| Cbu 13          | 104 | Kırklareli | Koyun | 28,61 | 1,85 | 1,86 |
| Cbu 14          | 48  | Tekirdağ   | Koyun | 21,34 | 1,94 | 1,96 |
| Cbu 15          | 14  | Tekirdağ   | Koyun | 27,68 | 1,80 | 2,01 |
| Cbu 16          | 101 | Tekirdağ   | Koyun | 14,69 | 1,86 | 1,99 |
| Cbu 17          | 5   | Çanakkale  | Keçi  | 19,06 | 1,99 | 1,69 |
| Cbu 18          | 81  | Kırklareli | Keçi  | 19,21 | 2,09 | 2,12 |
| Pozitif Kontrol | PK  |            |       | 11,47 |      |      |
| Negatif Kontrol | NK  |            |       | 0     |      |      |



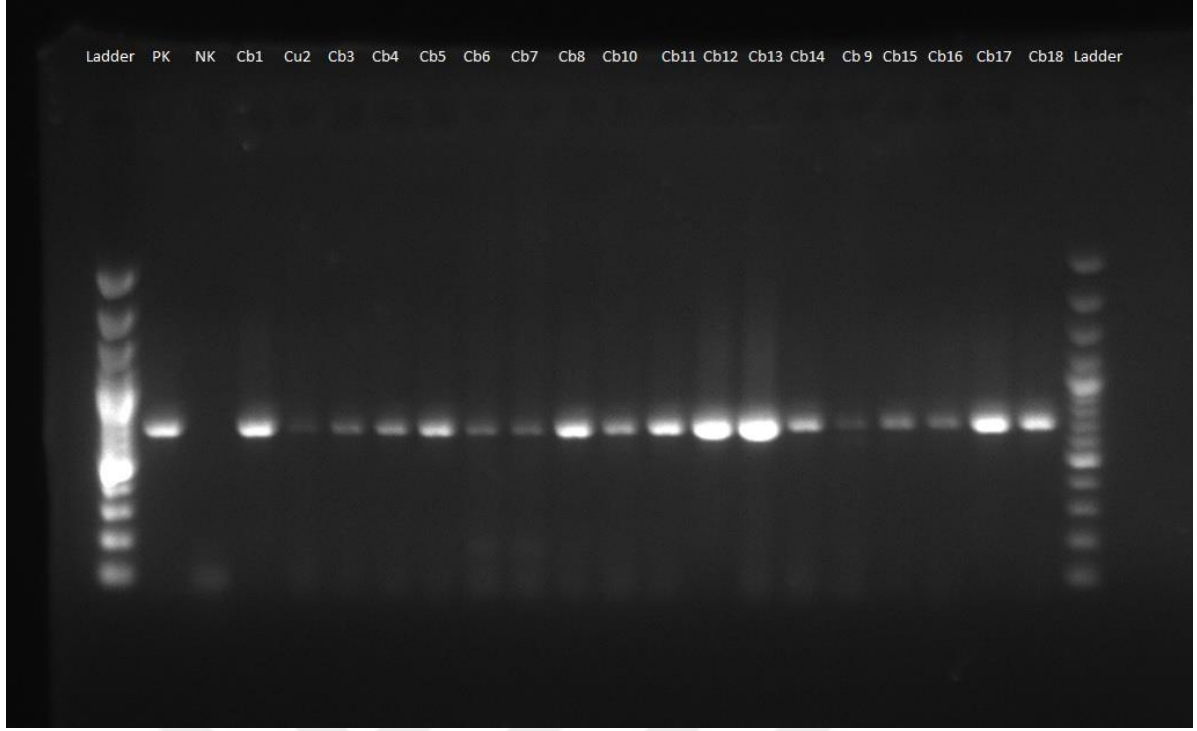
Şekil 7. Real Time analiz sonuçlarına ait grafik.

#### 4.3. Nested PCR bulguları

Real time PCR analizi sonucunda pozitif olarak tespit edilen 3 adet sığır, 13 adet koyun ve 2 adet keçi olmak üzere toplam 18 adet numune nested PCR ile tekrar analiz edildi. IS1111 gen bölgesine spesifik Trans1, Trans2, Trans3 ve Trans4 primerleri ile analiz edilen 18 numunede real time PCR analizi ile benzer şekilde pozitif olarak belirlendi. Trans 1 ve Trans 2 analiz sonucunda hayvan türleri ile numunelerin alındığı illere göre pozitiflik dağılımı Tablo 15’de gösterildi. Sığır örneklerinin incelemelerinde yalnızca Edirne, Bursa ve Balıkesir illerinde pozitiflik belirlendi. Koyun örneklerinde Edirne, Balıkesir, Çanakkale, Kırklareli ve Tekirdağ, keçi örneklerinde ise Çanakkale ve Kırklareli illerinde pozitiflik belirlendi. Nested PCR Trans 1 ve Trans 2 analiz sonucunda elde edilen 687 bp’de elde edilen pozitif bantların agaroz jel görüntüsü Resim 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 15.** İllere ve türlere göre numune ve pozitiflik sayıları.

| İl         | Sığır |   | Koyun |    | Keçi |   | Manda |   |
|------------|-------|---|-------|----|------|---|-------|---|
|            | N     | n | N     | n  | N    | n | N     | n |
| İstanbul   | 3     | 0 | 4     | 0  | 0    | 0 | 4     | 0 |
| Edirne     | 5     | 1 | 8     | 2  | 2    | 0 | 0     | 0 |
| Kocaeli    | 3     | 0 | 6     | 0  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| Bursa      | 4     | 1 | 8     | 0  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| Balıkesir  | 5     | 1 | 10    | 3  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| Çanakkale  | 2     | 0 | 5     | 1  | 3    | 1 | 0     | 0 |
| Kırklareli | 3     | 0 | 9     | 4  | 3    | 1 | 0     | 0 |
| Tekirdağ   | 2     | 0 | 11    | 3  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| Yalova     | 1     | 0 | 1     | 0  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| Düzce      | 2     | 0 | 1     | 0  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| Sakarya    | 1     | 0 | 1     | 0  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| Bilecik    | 1     | 0 | 0     | 0  | 0    | 0 | 0     | 0 |
| TOPLAM     | 32    | 3 | 64    | 13 | 8    | 2 | 4     | 0 |



**Resim 2.** Nested PCR Trans 1 ve Trans 2 analiz sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü.  
PK: Pozitif Kontrol; NK: Negatif Kontrol; Cb1-18: Real Time analizde pozitif olarak kaydedilen numunlerin Nested PCR analiz çalışması.

#### 4.4. MLVA Analizi

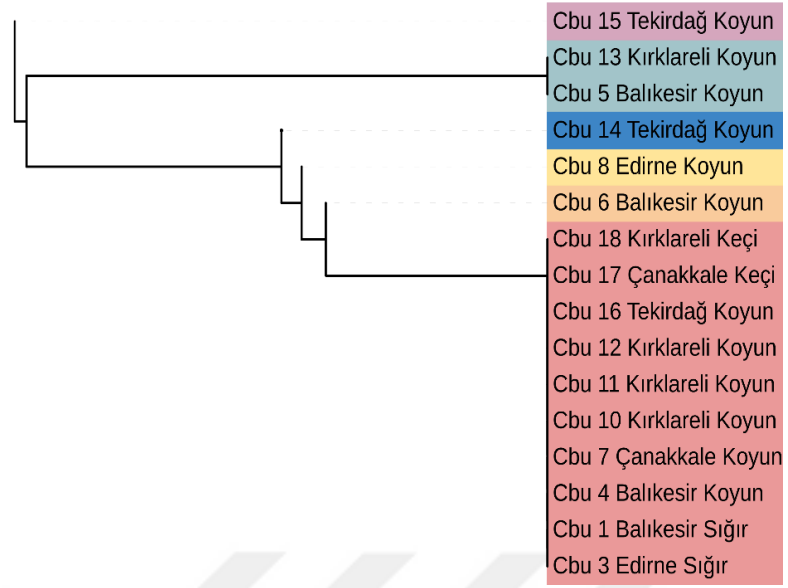
Real time PCR ve Nested PCR analizleri sonucunda *C. burnetii* pozitif olarak tespit edilen 18 adet örnekte bulunan *C. burnetii*'lerin moleküler epidemiyolojisinin incelenmesi amacıyla MLVA analizi gerçekleştirildi. *C. burnetii* kromozomal DNA'sı üzerinde MS23, MS24, MS27, MS28, MS33 ve MS34 lokuslarında tekrar eden gen bölgelerinin tekrar sayıları belirlendi. İncelenen 18 adet pozitif örnek içerisinde yalnızca Cbu 2 ve Cbu 9 kodlu numunelerde MLVA analizinin değerlendirmelerinde uygun sonuç alınmadığı için değerlendirme dışı tutuldu. Real Time PCR'da sırasıyla CT: 30,05 ve 29,05 değer veren Cbu2 ve Cbu9'un, Nested PCR'da da ilgili numunelerin bant ışımlarının azlığı dikkat çekti. Bu 2 örnek arasında meydana gelen silinme işleminin, MLVA tiplemesi sırasında bu işaretçide gözlemlenebilecek amplifikasyon hatalarını açıklayan ms26 kaybıyla sonuçlandığını göstermektedir.

Diğer 16 adet pozitif örnekte MLVA profillerine ait genel veriler Tablo 16'de verildi.

**Tablo 16.** 16 adet pozitif örnekte MLVA profillerine ait genel veriler.

| Numune kodu   | İl         | Hayvan türü | GG  | MLVA |      |      |      |      |      |
|---------------|------------|-------------|-----|------|------|------|------|------|------|
|               |            |             |     | MS23 | MS24 | MS27 | MS28 | MS33 | MS34 |
| <i>Cbu 1</i>  | Balıkesir  | Sığır       | VI  | 6    | 15   | 2    | 7    | 12   | 11   |
| <i>Cbu 3</i>  | Edirne     | Sığır       | VI  | 6    | 13   | 4    | 4    | 8    | 6    |
| <i>Cbu 4</i>  | Balıkesir  | Koyun       | VI  | 6    | 13   | 4    | 3    | 7    | 6    |
| <i>Cbu 5</i>  | Balıkesir  | Koyun       | II  | 6    | 0    | 4    | 4    | 0    | 7    |
| <i>Cbu 6</i>  | Balıkesir  | Koyun       | V   | 3    | 9    | 4    | 5    | 0    | 2    |
| <i>Cbu 7</i>  | Çanakkale  | Koyun       | VI  | 6    | 13   | 3    | 7    | 9    | 12   |
| <i>Cbu 8</i>  | Edirne     | Koyun       | IV  | 5    | 15   | 5    | 0    | 8    | 7    |
| <i>Cbu 10</i> | Kırklareli | Koyun       | VI  | 3    | 16   | 9    | 2    | 7    | 3    |
| <i>Cbu 11</i> | Kırklareli | Koyun       | VI  | 6    | 13   | 3    | 7    | 9    | 11   |
| <i>Cbu 12</i> | Kırklareli | Koyun       | VI  | 6    | 13   | 3    | 7    | 9    | 11   |
| <i>Cbu 13</i> | Kırklareli | Koyun       | II  | 6    | 0    | 4    | 5    | 0    | 4    |
| <i>Cbu 14</i> | Tekirdağ   | Koyun       | III | 0    | 13   | 4    | 3    | 7    | 2    |
| <i>Cbu 15</i> | Tekirdağ   | Koyun       | I   | 0    | 0    | 5    | 4    | 8    | 8    |
| <i>Cbu 16</i> | Tekirdağ   | Koyun       | VI  | 6    | 13   | 3    | 7    | 10   | 9    |
| <i>Cbu 17</i> | Çanakkale  | Keçi        | VI  | 6    | 12   | 4    | 4    | 8    | 8    |
| <i>Cbu 18</i> | Kırklareli | Keçi        | VI  | 6    | 13   | 2    | 7    | 9    | 11   |

Elde edilen MLVA genotip profillerine göre dendrogram oluşturuldu ve 16 adet pozitif örnekte 6 genotip grubu tespit edildi. Genotip gruplar arasında en büyük grubun VI. grup olduğu belirlendi. Pozitif örneklerin %62,5 (10/16)'i VI genotip grubunda olduğu belirlendi. Büyük kısmı koyun örnekleri tarafından oluşan VI genotip grubu içerisinde sığırlardan alınan aborte fetüs ve plasenta örneklerinin ikisi de yerleşim gösterdi.



**Resim 3.** 16 adet numuneye ait MLVA analiz sonucunda oluşan gruplar.

MLVA analizi sonucunda oluşturulan gen lokus gruplarının çember diyagramına ait görüntü Ek.1’de sunulmuştur.

## 5. TARTIŞMA

Yeni Zelanda ve Antartika dışında dünya çapında yaygın olan ve zoonotik, zorunlu hücre içi bir bakteri olan *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu Q humması, insanların yanı sıra başta sığır, koyun ve keçiler olmak üzere evcil ruminant hayvanlarda abortlara neden olan ajandır. Q humması, dünya çapında hem veterinerlik hem de halk sağlığı açısından endişe verici bir hastalıktır. İnsanlar tipik olarak, hayvanlar veya hayvansal ürünler tarafından üretilen bulaşıcı aerosoller ve kontamine tozu soluyarak Q humması hastalığını alırlar. Bununla birlikte, doğal rezervuarların aralığı geniştir. Hem vahşi hem de evcil memelileri, kuşları ve keneler gibi eklembacaklıları içerir (Maurin ve Raoult, 1999).

Yaklaşık 40 kene türünün *Coxiella burnetii* etkenini gerek vertikal (transovarial) bulaşma yollarıyla gerekse de horizontal (ısırık, dışkı vs. ile saçılımlarla) bulaşma yollarıyla memelilere ve kuşlara bulaştırabilirler. Enfeksiyon etkeninin doğal döngüsünde üreyip çoğalması için enfekte keneler önemli role sahiptirler (Parola ve Raoult, 2001). Amerika Birleşik Devletleri Georgia Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada; çiftlik hayvanları ve barınaklardan farklı türlerde toplanan 450 adet kenelerin PCR metoduyla analizi sonucunda 144 adedinde *Coxiella burnetii* etkeninin DNA dizisine rastlanmıştır. Her hayvandan bir kene olarak yapılan çalışmadan 450 hayvan üzerinden değerlendirildiğinde oran %32 olarak istatistik edilmiştir. Bu da kene ile parazitlenmiş hayvanların %32'inde Q humması hastalığını olduğunu göstermektedir (Smoyer, 2006). Benzer bir çalışma 2011 yılında Almanya'da çalışılmış buna göre; *Ixodes ricinus* keneleri üzerine yoğunlaşmışlardır. Çalışmada 277 erkek ve 293 kadın insandan toplanan kenelere ilaveten 430 adet de çiftlik hayvanlarından toplanan *Ixodes* kenelerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Toplam 1000 adet kene numunesinin 19 adedinde (%1.9 istatistiksel oranıyla) PCR yöntemiyle *Coxiella burnetii* etkeni tespit edilmiştir (Hildebrandt ve diğerleri, 2011). 2009 yılında İspanya'da 443 adedi çiftlik hayvanlarından toplanan toplam 1482 adet kene örneğinin PCR ile yapılan tespit çalışmasında 95 adedinin pozitif bulunması ve %6.4'lük oranın kenelerin Q humması etkenini saçmasında ne kadar önemli rol aldığını göstermektedir (Toledo ve diğerleri, 2009). Keneler üzerinde yapılan bir çalışma da Kıbrıs Rum Kesimi'ne aittir. Nicosia, Limassol, Larnaka, Famagusta ve Paphos şehirlerinden toplanan toplamda 141 kene numunesinin 11 adedinde *Coxiella burnetii* varlığı tespit edilmiş ve oran %7.8 olarak verilmiştir. Aynı çalışmada, IFA yöntemiyle yapılan serolojik araştırmada kenelere maruz kalmış kalmış 417 adet keçinin 201 adedinde (%48.2);

481 adet koyunun 91 adedinde (%91); 75 adet sığırın 18 adedinde (%18) seropozitif sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada sunulan verilerde IFA yöntemiyle Avrupa ve Kuzay Afrika Ülkelerinde yapılan çalışmalardaki seropozitif vakalar da karşılaştırılmış. Buna göre İtalya'da çiftlik hayvanlarında bu oran %6.1; Fransa'da %4.03; Yunanistan'da %38.1; Mısır'da %32; Fas'ta %18.3 ve Tunus'ta %26 olarak verilmiştir (Psaroulaki ve diğerleri, 2006). Ülkemizde yapılan çalışmalar da ülkemizin 7 bölgesi toplam 38 ilinden toplanan 2472 kene örneği Nested PCR, Hfrag 1 ve Hfrag 2 primeriyle analiz edilmiş, ilk turda elde edilmesi gereken 508 bp'lik bantlar gölenmiş ancak ikinci turda kullanılan HF1 ve HF2 primeriyle elde edilmesi gereken 183 bp'lik bantlar ya silik ya da hiç gözlenmemiştir. Sadece 1.turdan elde edilen sonuçlar rapor edilmiştir. Buna göre Denizli İlinden gelen kene grup örneklerinde 6 grubu; Ankara İlinden gelen kene grup örneklerin 1 grubu etken pozitif tespit edilmiştir. Elde edilen 7 adet pozitif DNA'nın Nine Mile suşu ile aynı profilde olduğu PCR-RFLP ile ortaya konmuştur. (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Teknik Raporu, 2010).

*Coxiella burnetii*'nin teşhisinde serolojik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başlıcaları da ELISA, IFA, CFT ve MAT testleridir. Peter ve arkadaşlarının 1987'de yaptıkları çalışmada serolojik testler arasındaki duyarlılığı belirlemiştir. Buna göre CFT testinin %78'lik duyarlılığına karşın IFA yönteminde duyarlılık %91 iken ELISA'da bu oran %94 olarak belirtilmiştir. Sürü taramalarında ELISA yönteminin güvenilirliğinden bahsedilmiştir (Peter ve diğerleri, 1987). Ülkemizde Uğur Parın'a ait tez çalışmada 600 adet örnekle çalışılmış ve ELISA yöntemiyle 140 adet pozitiflik (%23.33), IFA yöntemiyle 148 adet pozitiflik (%24.66), PCR ile 214 adet pozitiflik (%34.66) elde etmiştir. Elde ettiği sonuçlar ışında ELISA metodunun kan serumundan *Coxiella burnetii* varlığının araştırması için uygun bir yöntem olduğundan bahsetmiştir (Parın, 2011).

Hastalık etkeninin izolasyonun zahmetli, pahalı ve BSL-3 laboratuvarı gibi yüksek güvenli laboratuvarlara ihtiyaç duymasından ötürü, hayvansal dokulardan tespitinin en güvenilir ve pratik yolu PCR analizleri gösterilmiştir. Bu çalışmada IS1111 sekans dizisi, *C. burnetii*'nin çoklu birçok kopyasını sunduğu ve özellikle tek kopya hedefleri üzerinde potansiyel olarak yüksek hassasiyete sahip olduğundan PCR hedefi olarak seçilmiştir. Bu nedenle birçok ülkede hem beşeri hem de veteriner tanı yöntemlerinde PCR testleri için hedef gen bölgesi olarak seçilip uygulanmaktadır (Hoover ve diğerleri, 1992).

Ülkemizde sığır abortları üzerine yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde; Küçükkalem ve ark., (2013) yılında Erzurum Bölgesinde yaptıkları çalışmada; 100 adet büyük ruminant abort materyali *Sod* gen bölgesiyle PCR metoduyla çalışılmış ve 6 adet *Coxiella*

*burnetii* tespit edilmiştir. Aydın Bölgesinde yapılan çalışmada Kırkan ve arkadaşları ise IS1111 bölgesini hedef alarak PCR analizi yaptıkları çalışmadan 138 adet Q humması şüpheli hayvan kan serumu örneğinin 6 adedinde (%4.3) *Coxiella burnetii* varlığını tespit etmişlerdir (Kırkan ve diğerleri, 2008). 2018 yılında Com 1 gen bölgesiyle Urfa yöresinde 227 adet ruminant atıklarından oluşan örneklerle yapılan bir PCR çalışmasında ise 132 adet sığır atık örneklerinden tespit edilen pozitiflik oranı %1.5 olarak bulunmuştur (Gürbilek ve diğerleri, 2018). 2009 – 2011 yılları arasında Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün sorumluluk alanında yer alan 12 ilden gelen 102 adet sığır 4 adet sığır etken pozitif (%3.92) tespitler yapılmıştır (Günaydın ve diğerleri, 2015).

IS1111 gen bölgesiyle Portekiz'de yapılan çalışmada sığır, koyun ve keçi abort materyalleri kullanılmış, sırasıyla 5/29 (%17.2), 9/25 (%36) ve 15/37 (%40.4) pozitif DNA tespit edilmiştir (Clemente ve diğerleri, 2009). 1997'de Japonya'da 92 adet infertilite, metritis ve mastitis hastalıklarından şüpheli sığır süt ve kan serumu örneklerinden yapılan çalışmada; infertilite problemi yaşayan ineklerin 2 adet kan serumu (%2.2) ve 19 adet süt numunesi (%20.4); metiritis ve mastitis olan ineklerin 6 adet kan serumu (%5.3) ve 32 adet süt numunesi (%28) PCR *C. burnetii* pozitif olarak kayıt edilmiştir. Sütlerin toplamda 51 adedinde (%24.6) pozitif iken kan serumlarının da toplamda 8 adedinde (%3.9) DNA tespit edilmiştir (To ve diğerleri, 1998). 2017 yılında Mısır'da sığır, koyun, keçi ve mandalardan plasenta ve vajinal swap örneklerinden çalışma yapılmış. Çalışmada IS1111 gen bölgesi PCR ile analiz edilmiş ve 26 adet sığır, 27 adet koyun, 29 adet keçi, 26 adet mandaya ait numelerden sadece 1 adet keçiye ait örnekten pozitiflik kaydetmişlerdir (Abdel-Moein ve diğerleri, 2017).

Ülkemizde Q hummasının koyunlardaki varlığı ve yaygınlığı üzerine yapılan araştırmalar değerlendirildi. Urfa yöresinde 72 adet koyun atık örneklerinden tespit edilen pozitiflik oranı %2.7 olarak bulunmuştur. Com 1 geninden yapılan bu çalışmada hem Real time PCR metodu hem de Konvansiyonel PCR metodu paralel çalışılmış ve pozitiflik sonuçları aynı çıkmıştır (Gürbilek ve diğerleri, 2018). Erzincan. Erzurum ve Ağrı illerinden 2020'de koyunlardan alınan 271'er adet kan serumu ve süt numunelerine ELISA yöntemiyle bakılmış, sonucunda kan örneklerinde %24.3, süt örneklerinde % 12.2 oranında Q humması yönünden seropozitiflik yakalanmıştır. Aynı çalışmada numune alınan işletmenlerden alınan sütlerle peynir imalatı yapılan işletmeden 90 adet peynir örneği alınmış ve IS1111 bölgesinden konvamsiyonel PCR testi yapılmış, % 5.6 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Yanmaz, 2021). 2009 – 2011 yılları arasında Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma

Enstitüsü Müdürlüğü'nün sorumluluk alanında yer alan 12 ilden gelen 45 adet koyun abort mide içeriklerinden yapılan IS1111 hedef gen bölgesinin konvensiyonel PCR ile yapılan çalışmasında alınan sonuçlara göre 5 adet koyun etken pozitif (%11.11) tespitler yapılmıştır (Günaydın ve diğerleri, 2015).

İran'da abort edilen küçükbaş hayvanlarda *C. burnetii* prevalans oranı (%15.47), kuzey İspanya'dan (%9) (Oporto ve diğerleri, 2006) ve İtalya'dan (%10) (Masala ve diğerleri, 2004) daha yüksektir, ancak Hollanda'dan daha düşük (%80'e kadar) (Roest ve ark., 2011) ve İran'da abort edilen keçi fetüslerinde *C. burnetii* prevalans oranları (%20.43) Birleşik Krallık'tan (%25) daha yüksektir (Jones ve ark., 2010) ve Hollanda'dan (%80'e kadar) (Roest ve diğerleri, 2011) ve İtalya'dan (%21,5) daha düşüktür (Parisi ve diğerleri, 2006).

Keçi abort örneklerinde *C. burnetii* pozitiflik oranı üzerine ülkemizde yapılan araştırmalar arasında, 2018 yılında Urfa'da yürütülen bir araştırmada 23 adet keçi atık örneklerinden tespit edilen pozitiflik oranı %1.8 olarak bulunmuştur (Gürbilek ve diğerleri, 2018). Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün sorumluluk alanında yer alan 12 ilden gelen 5 adet keçi abort mide içeriklerinden yapılan IS1111 hedef gen bölgesinin konvensiyonel PCR ile yapılan çalışmasında alınan sonuçlara göre 2 keçi etken pozitif (%40) tespitler yapılmıştır (Günaydın ve diğerleri, 2015). 2009 yılında İspanya'da küçük ruminantlardan yapılan PCR çalışmasında 35 adet koyun ve 23 adet keçi abort materyali *C.burnetti*, *C.abortus* ve *Salmonella abortus ovis* etkenleri için analiz edilmiştir. Koyunlarda 4 adet, keçilerden de 4 adet olmak üzere toplamda 8 adet *Coxiella burnetii* tespit edilmiştir. Yüzde oranları ise koyunlarda %11.4 ve keçilerde ise %17.4 olarak belirtilmiştir (Navarro ve diğerleri, 2009).

Q hummasının mandalarda varlığı üzerine ülkemizde çok fazla yayına rastlanılamadı. Günaydın ve Petekkaya'nın Afyon'dan gelen 92 adet manda kan serumundan ELISA ve Tochtown PCR yöntemiyle Q humması etkeni araştırılmış; 8 adedinin (%8.69) kan serumunda *C.burnetii* antikoru ELISA yöntemiyle tespit edilmiş ancak hiçbir numunede DNA'ya rastlanmamıştır. 2019 yılında İran'da manda ve sığır sütlerinde IS1111 gen bölgesini Nested PCR ile çalışan Khadeni ve arkadaşları toplam 840 adet çiğ süt örneği almışlar. 142 adet (%16,9) toplam pozitiflik kaydeden araştırmacılar, sığırdan 61 adet (%14,6) pozitiflik tespit ederken manda da ise 81 adet (%19,3) ile daha yoğun pozitiflik tespit etmişlerdir (Khademi ve diğerleri, 2019). Hindistan'da 2019 yılında yapılan bir çalışmada 232 adet manda sütü toplanmış, IS1111 geniyle Trans PCR yöntemi uygulanmış ve 2 adet (%0,86) pozitiflik kaydedilmiştir (Keshavamurthy ve diğerleri, 2019). 2009 yılında İtalya manda atık

materyalleri ile kapsamlı bir çalışma yapılmış. Çalışmaya göre aborte fetüs numunelerinden 95 adet beyin, 112 adet karaciğer, 86 adet mide içeriği, 121 adet dalak ve 59 adet plasenta ekstrakte edilmiş one-tube Nested PCR ile IS1111 gen bölgesine bakılmış. Toplamda analiz edilen 473 doku örneğinin 15'inde (%3.17) *C. burnetii* transpozon benzeri elemente karşılık gelen, beklenen boyutta (200 bp) bir amplikon elde edilmiş. Pozitif numuneler arasında plasenta, % 53.4'lik bir oranla pozitif sonuçların en yüksek oranda görüldüğü doku kabul edilmiş. Numune toplanan manda işletmelerinin ise 14'ü (%17) *Coxiella burnetii* için enfekte olarak kabul edilmiştir (Perugini ve diğerleri, 2009).

Ülkemizde yapılan yukarıda belirtilen çalışmalarda Q humması etkeni *Coxiella burnetii*'nin DNA tespitinde tespit oranları sığır, koyun ve keçi için %1 ile %12 arasında yer almaktadır. Mandayla yapılmış çalışmada ise herhangi bir DNA tespit edilmedi. Mevcut çalışmamızda 108 adet ruminant örneğinden Real Time ve Nested PCR kullanarak toplamda 18 adet *C.burnetii* DNA pozitif olarak belirlendi. Sığır örneklerinin 32 adedinden 3 tanesini pozitif bularak %9,4'lük prevalans; koyun örneklerinin 64 adedinden 13 tanesini pozitif bularak %20,3'lük prevalans; keçi örneklerinin 8 adedinden 2 tanesini pozitif bularak %25'lik prevalans elde edildi. Manda örneklerinin tamamında *C.burnetii* tespiti yapılamadı. Bu sonuçlar ışığında ülkemizde PCR teknikleriyle yapılan *C.burnetii* etken DNA tespiti sonuçlarıyla paralellik gözlemlendi. Bu çalışmada gerçekleştirdiğimiz sığır analizlerinde yukarıdaki çalışmalara göre daha düşük oranda pozitiflik tespit edildi, buna rağmen koyun ve keçi analizlerindeki sonuçlarda daha yakın pozitiflik oranı elde edildi.

İncelenen 18 adet pozitif örnek içerisinde yalnızca Cbu 2 ve Cbu 9 kodlu numunelerde meydana gelen silinme işleminin, MLVA tiplemesi sırasında bu işaretçide gözlemlenebilecek amplifikasyon hatalarını açıklayan ms26 kaybıyla sonuçlandığını göstermektedir. Real Time PCR'da sırasıyla CT: 30,05 ve 29,05 değer veren Cbu2 ve Cbu9'un, Nested PCR'da da ilgili numunelerin bant ışımların azlığı dikkat çekti. Sidi-Boumedine K ve arkadaşlarının yaptığı MLVA çalışmasında bizimkine benzer lokus kayıtları yaşanmıştır (Sidi-Boumedine ve diğerleri, 2015).

Sunulan tez çalışmasında toplam 16 adet sığır, koyun ve keçi aborte fetüs ve plasenta örneklerindeki *C. burnetii* genotipik varyasyonlarının araştırılması MLVA ile gerçekleştirildi. Araştırma sonucunda 16 adet pozitif dokunun 6 adet genotip gruba ayrıldığı tespit edildi. I. Genotip grubunu oluşturan ve Tekirdağ ilinden bir koyundan tespit edilen Cbu15 örneği, Domenico ve diğerleri, (2018)'nın İtalya'da koyundan tespit ettikleri *C. burnetii* genotipi ile aynı grupta olduğu tespit edildi (Domenico ve diğerleri, 2018). Genotip grup II içerisinde yer

alan Kırklareli ve Balıkesir illerinden alınan koyun örnekleri olan Cbu5 ve Cbu13 pozitif örnekleri, İspanya, İtalya, Fransa ve Slovenya’da koyun ve süt örneklerinde bulunan *C. burnetii* örnekleri ile aynı grupta lokalize olduğu belirlendi (Tilburg ve diğerleri, 2012, Astobiza ve diğerleri, 2012, Domenico ve diğerleri, 2018).

Tekirdağ ilinden alınan koyun örnekleri arasında Cbu14 örneğinin oluşturduğu III. genotip yapısı, Portekiz, İtalya, İspanya, Macaristan ülkelerinde kemirgen, koyun, keçi, yabani tavşan konaklarından izole edilen *C. burnetii*’ler ile aynı grupta yerleşim gösterdi (Cumbassa ve diğerleri, 2015, Ceglie ve diğerleri, 2015, Gonzales-Barrio ve diğerleri, 2016, Sulyok, Kreizinger ve ark 2014). Genotip IV olarak belirlenen ve Cbu8 numaralı Edirne ilinden alınan koyun aborte fetus örneğinde bulunan *C. burnetii*’nin Macaristan’da koyunda tespit edilen *C. burnetii* ile ve Hollanda menşeli bir süt örneğinde belirlenen *C. burnetii*’nin MLVA genotip profilinde olduğu belirlendi (Tilburg ve diğerleri, 2012, Sulyok, Kreizinger ve ark 2014). Araştırmada V numaralı genotip yapısını gösteren Cbu6 örneği Balıkesir ilinde koyundan alınan örnektir. Bu örneğin MLVA genotip profili, Portekiz, İspanya, İtalya ülkelerinde geyik, keçi ve sığırlardan tespit edilen *C. burnetii*’lerin MLVA profilleri ile aynı grupta olduğu belirlendi (Cumbassa ve diğerleri, 2015, Gonzales-Barrio ve diğerleri, 2016, Domenico ve diğerleri, 2018).

Araştırmada bulunan en büyük genotip grup VI numaralı genotip grubudur. Bu grupta bulunan *C. burnetii* tespit edilen örnekler keçi, koyun ve sığırlardan alınan örneklerdir. Sığır ve keçilerde tespit edilen ve MLVA sonucu alınan tüm örnekler bu grupta lokalize oldu. Örnekler; Edirne, Balıkesir, Çanakkale, Kırklareli ve Tekirdağ illerinden alınan illerdir. Bu grupta bulunan MLVA profili; Arjantin, Brezilya, Katar, Fransa, Almanya, Hollanda, Portekiz, Slovenya, Hırvatistan, İngiltere, Mısır, Etiyopya, Macaristan, İtalya, Polonya, Rusya, Sudi Arabistan, İspanya ve İsviçre ülkelerinde sığır, geyik, keçi, insan, koyun, kene, yabani tavşan konakları ve satışa sunulan süt örneklerinde tespit edilen *C. burnetii*’lerin MLVA profilleri ile benzer olduğu tespit edildi (Mioni ve diğerleri, 2020, Tilburg ve diğerleri, 2012, Racic ve diğerleri, 2014, Cumbassa ve diğerleri, 2015, Chmielewski ve diğerleri, 2009, Tilburg, Rossen ve diğerleri, 2012, Pinero ve diğerleri, 2015, Santos ve diğerleri, 2012, Ceglie ve diğerleri, 2015, Gonzales-Barrio ve diğerleri, 2016, Sulyok ve diğerleri, 2014, Domenico ve diğerleri, 2018, Astobiza ve diğerleri, 2012, Sulyok, Kreizinger ve ark 2014). Araştırmada en büyük grup olarak bulunan VI. genotip grubu birçok araştırmadaki genotip profil ile aynı grupta lokalize olması ve birçok farklı konakta bulunması, bu genotipin saçılımı fazla olan ve

bölgede dominant bir genotip olduğunu desteklemektedir. Ayrıca yabani ve evcil konaklarda tespit edilmiş olması bulaşın vahşi hayvanlar kaynaklı olabileceğini düşündürdü.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Marmara Bölgesinde yer alan 12 ilden toplanan 32 sığır, 4 manda, 64 koyun, 8 keçi olmak üzere toplam 108 adet evcil ruminantlara ait aborte fetüs ve plasental örneklerinde *C.burnetii* varlığının tespiti ve MLVA yöntemiyle pozitif DNA'ya sahip numunlerin diğer *Coxiella burnetii* suşlarıyla olan ilişkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında; hem Real Time hem de Nested PCR yöntemleriyle 18'er adet paralel *C.burnetii* DNA'sı saptanmıştır. 16 pozitifliğin MLVA yöntemiyle çalışılması sonucunda yakın ilişkisi bulunan suşlar önceki bölümlerde belirtilmiştir.

Bu çalışma, abort vakalarının olduğu koyun ve keçi sürülerinde *C. burnetii*'nin tespiti için hızlı, güvenli ve doğru tanı yöntemleri olarak Nested PCR ve Real Time PCR testlerinin yaygın olarak kullanılabileceğini, ancak Real Time PCR testinin daha hızlı, ucuz, hassas ve duyarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, termal döngü sonrası jel elektroforezi analizini gerektirmez ve Nested PCR yöntemine göre çapraz kontaminasyon riski sınırlıdır. Bu çalışma, *C. burnetii*'yi Nested PCR ile tespit etmenin Real Time PCR testine göre daha teknik, bilgi ve deneyim gerektiren, zaman alıcı ve daha çok iş gücü isteyen yoğun bir analiz olduğunu göstermiştir. Bildiğimiz kadarıyla, vakaların çoğunda plasenta ve fetüs iç organlarının Q humması atık teşhisini görebilmek için ideal örneklerdir, ancak örneklerin kirli ortamlarda biyogüvenlik ve hijyen kurallarına uyulmadığı bazı durumlarda diğer patojenlerle kolayca kontamine olabilir. Çalışmamızda bütün halde aborte fetüs ve plasentasını numune olarak kullanmak hem etken tespit oranını arttırmış hem de kontaminasyonu azaltmak için avantaj sağlamıştır. PCR çalışmalarında tekrarlayan elementin birden fazla genomik kopyaya sahip olması ve böylece test duyarlılığını arttırması nedeniyle IS1111 gen bölgesinin tespit edilme bölgesi olarak seçilmiş olması da ayrıca avantaj sağlamıştır.

*C. burnetii*'nin abort oranı, gebe hayvanların %3 ila %80'i arasında değişebilir (Berri ve diğerleri, 2000; Palmer ve diğerleri, 1983; Zeman ve diğerleri, 1989). Bazı keçi sürüleri dışında, yüksek abortus oranları nadiren gözlenmektedir (Palmer ve diğerleri, 1983). Çoğu zaman, sürüde kayıp kabul edilen hayvan sayısı, yetiştiricide farkındalık oluşturmak için yeterli olmayabilir ancak insan klinik vakaları genellikle sürünün enfeksiyonunu ortaya çıkarır (Berri ve diğerleri, 2000). Koyunlar, keçilere göre daha fazla ve daha uzun süre vajinal akıntı döker ve sonraki gebeliklerde bakteri yayabilir. Q humması hastalığının etkeni olan *C.burnetii*'nin enfekte hayvanlarda gerek doğum sırasında gerekse de atık yaptığı sırada vücut

sıvıları ve doğum materyalleriyle yoğun şekilde çevreye saçılmaktadır (Berri ve diğerleri, 2003). Aşı ve ilaç kullanımı ile kontrol altına alınamayan bu önemli zoonoz konusunda, çevresel kirlenmenin büyüklüğü biyogüvenlik ve sanitasyon, temizlik önlemlerinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Diğer hayvanlara ve en önemlisi insana bulaşlarda riskin azaltılması alınacak önlemlerle mümkündür. Bunlar;

- Ölü yavru ve her türlü kontamine altlık, malzeme, plasenta vs gibi risk taşıyan materyalin hızla uzaklaştırılması ve imha edilmesi,
- Kontamine materyalin asla hayvan yemi vb olarak kullanılmaması,
- Enfeksiyonun görüldüğü işletmelerde, sıkı dezenfeksiyon yapılması,
- Abort yapan hayvanın işletme içinde serbest dolaşımı engellenmesi,
- Özellikle doğum yapacak hayvanların bulunduğu bölümde hijyenik önlemlerin alınması,
- Ayrılmış doğum bölgesi kullanılması,
- Keneler, *Coxiella burnetii* etkeninin doğal döngüsünde çoğalmasında önemli rol oynar, vertikal (transovarial) ve horizontal (ısırık, dışkı) bulaşma yollarıyla memelilere ve kuşlara bulaştırabilirler. (Parola ve Raoult, 2001). Enfeksiyonun taşınmasında önemli rol oynayan kenelerle aktif mücadele bulunması,
- Özellikle doğumuna 2- 3 hafta kalmış hayvanların hareketlerinin sınırlandırılması gibi alınacak basit önlemlerle hemen tüm zoonazlarda olduğu gibi bulaşma, saçılma risklerini en aza indirmek mümkündür.

Ayrıca, enfeksiyonun bildiriminin zorunlu hale getirilmesi, hastalık çıkışı olan yerlerde sıkı dezenfeksiyon yanında zorunlu karantinanın uygulanabilir olması, halk sağlığı açısından bazı Avrupa ülkelerinde olduğu gibi, enfeksiyonun önemli kaynağı olan süt ve süt ürünlerinin dağıtımı hastalık çıkan işletmelerde sönüş raporu düzenlenene kadar yasaklanabilmesi, hastalıktan arı işletmeler kurulması, desteklenmesi enfekte sürü prevelanslarının da zaman içinde azalmasına olanak sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- 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. doi:10.1016/j.actatropica.2016.11.01.
- Alibek K. (1999). Biohazard. New York, NY: Random House, 1999: 29–38.
- Ammerdorffer, A., Kuley, R., Dinkla, A., Joosten, L., Toman, R., Roest, H. J., Sprong, T., Rebel, J. M. (2017). *Coxiella burnetii* isolates originating from infected cattle induce a more pronounced proinflammatory cytokine response compared to isolates from infected goats and sheep. 75(4), <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx040>.
- Angelakis, E., Raoult, D. (2010). Q Fever. Veterinary microbiology, 140(3-4), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.016>.
- Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., (2005). *Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?* Vet Res. 36(3), 327-349.
- Arricau-Bouvery N., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis A., (2003). *Experimental Coxiella burnetii infection in pregnant goats: excretion routes*. Vet Res. 34(4), 423-433.
- Astobiza I., Barandika JF., Hurtado A., Juste RA., Garcia-Perez AL., (2010). *Kinetics of Coxiella burnetii excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline*. Vet J 184:172–175.
- Astobiza I., Tilburg J., Piñero A., Hurtado A., García-Pérez A. L., Nabuurs-Franssen M. H., Klaassen C. H. (2012). *Genotyping of Coxiella burnetii from domestic ruminants in northern Spain*. BMC veterinary research, 8, 241. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-241>.
- Babudieri, B., (1959). *Q fever: a zoonosis*. Adv Vet Sci Comp Med. 5, 81-181.
- Baker S., Hanage WP., Holt KE., (2010). *Navigating the future of bacterial molecular epidemiology*. Curr Opin Microbiol 13:640–645.
- Bauer AE., Johnson AJ., Weng HY., Pogranichniy RM., Moore GE., (2017). *An evaluation of risk factors for infection with Coxiella burnetii in domestic goats*, Research in Veterinary Science, 114, 181-185.

- Berberoğlu U., Gozalan A, Kılıç S, Kurtoğlu D, Esen B. (2004). *A seroprevalence study of in Antalya, Diyarbakir and Samsun provinces*. Mikrobiyol Bül; 38: 385-391, 2004.
- Bosnjak E, Hvass AM, Villumsen S, Nielsen H (2010) *Emerging evidence for Q fever in humans in Denmark: role of contact with dairy cattle*. Clin Microbiol Infect 16:1285–1288.
- Brom, R. V. den, Engelen, E. va., Roest, H. I. J., Hoek, W. va. der, & Vellema, P. (2015). *Coxiella burnetii infections in sheep or goats: an opinionated review*. Veterinary Microbiology, 181(1-2), 119–129. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.011.
- Burnet FM, Freeman M (1937) *Experimental studies on the virus of “Q” fever*. Med J Aust 2:299–305 .
- Cantaş H, Muwonge A, Sareyyupoglu B, Yardımcı H, Skjerve E (2011) *Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus*. BMC Veterinary Research. 7:13, 1-7.
- Centers for Disease Control and Prevention, (erişim 2021), <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
- Ceglie, L., Guerrini, E., Rampazzo, E., Barberio, A., Tilburg, J. J., Hagen, F., Lucchese, L., Zuliani, F., Marangon, S., Natale, A. (2015). *Molecular characterization by MLVA of Coxiella burnetii strains infecting dairy cows and goats of north-eastern Italy*. Microbes and infection, 17(11-12), 776–781. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.029>.
- Chmielewski, T., Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Podsiadly, E., Thiéry, R., Tylewska-Wierzbowska, S. (2009). *Molecular epidemiology of Q fever in Poland*. Polish journal of microbiology, 58(1), 9–13.
- Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM Jr. (1997). *Biological warfare: a historical perspective*. JAMA 1997; 278: 412–17.
- 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 SA, Fischer ER, Cockrell DC, Voth DE, Howe D, Mead DJ, Samuel JE, Heinzen RA (2007) *Proteome and antigen profiling of Coxiella burnetii developmental forms*. Infect Immun 75:290–298. %U <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/75/1/290>.

- Cohen, I.R., Lajthia, A., Lambris, J.D. ve Paoletti, R., (Editörler), (2012). *Coxiella burnetii:Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium (Birinci baskı)*. London:Springer Yayıncılık.
- Cumbassa A, Barahona MJ, Cunha MV, Azorin B, Fonseca C, Rosalino LM, Tilburg J, Hagen F, Santos AS, Botelho A, (2015) *Coxiella burnetii* DNA detected in domestic ruminants and wildlife from Portugal, *Veterinary Microbiology*, 180, 136-141.
- Çetinkaya B, Kalender H, Ertas HB, Muz A, Arslan N, Ongor H, Gurcay M. (2000). *Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey*. *Vet. Rec*, 2000,146(5):131-136.
- Davis, GE., Cox, HR., (1938). *A filter-passing infectious agent isolated from ticks, Isolation from Dermacentor andersonii, reactions with animals, and filtration experiments*. *Public Health Rep* 53:2259–2276.
- Derrick, EH., (1937). *Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis, and laboratory investigation*. *Med J Aust* 2:281–299".
- Di Domenico, M., Curini, V., Di Lollo, V., Massimini, M., Di Gialleonardo, L., Franco, A., Caprioli, A., Battisti, A., Cammà, C., (2018). *Genetic diversity of Coxiella burnetii in domestic ruminants in central Italy*. *BMC veterinary research*, 14(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1499-8>.
- Dyer, RE., (1938). *A filter-passing infectious agent isolated from ticks, IV. Human infection*. *Public Health Rep* 53:2277–2282.
- Dyer, RE., (1939). *Similarity of Australian “Q” fever and a disease cause by an infectious agent isolated from ticks in Montana*. *Public Health Rep* 54:1229–1237.
- Gazyagcı S, Aktaş MS, Kılıç S, Babur C, Çelebi B, Duru SY., (2011). *Seroprevalence of Q fever in dairy cattle in the Konya province, Turkey*. *Revue Med Vet*. 162. 387-390.
- Ediz Kağan, ÖZGEN., (2020). *Farklı Klinik Vakalarda İnsan ve Hayvanlardan Tespit Edilen Coxiella Burnetii’lerin Genotipik Varyasyonlarının Araştırılması*. TAGEM/HSGYAD/B/19/A5/P1/892 Projesi.
- González-Barrio, D., Hagen, F., Tilburg, J. J., Ruiz-Fons, F. (2016). *Coxiella burnetii Genotypes in Iberian Wildlife*. *Microbial ecology*, 72(4), 890–897. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0786-9>.

- Gözalın, S., Rolain, JM., Ertek, M., Angelakis, E., Coplu, N., Bařbulut, EA., Korhasan, BB., Esen, B., (2010). *Seroprevalence of Q fever in a district located in the west Black Sea region of Turkey*. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases. Vol 29 Issue 4, 465-469.
- Günaydın, E., Müřtak, H.K., Sareyyüpoęlu, B. Ata, Z., (2015). *Ruminantların Fötal Abomasal İğeriklerinde Coxiella burnetii'nin PCR ile Tespiti*, Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 21 (1): 69-73 pp
- Gürbilek, S.E., Keskin, O., Yięin, A., Yařar, O., (2018). *Ruminant Abortus Vakalarında Coxiella burnetii'nin Real-Time PCR ile Araştırılması*, Dergipark, Harran Veteriner Faköltesi, cilt:7, sayı :1, 79-83 s.
- Health E, Journal WJE. *Scientific Opinion on Q fever*. EFSA J, 2010,8(5):1595.
- Heinzen, R.A., Hackstadt, T., Samuel, J.E., (1999). *Developmental biology of Coxiella burnetii*. Trends Microbiol. 7(4), 149-154.
- Hendrix, Laura R., James E. Samuel, and Louis P. Mallavia. "Differentiation of Coxiella burnetii isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE." Microbiology 137.2 (1991): 269-276.
- Hildebrandt A., Straube E., Neubauer H., Schmooch G., (2011). *Coxiella burnetii And Coinfections in Ixodes ricinus Ticks in Central Germany*. Vector Borne Zoonotic Diseases, 11(8): 1205-7.
- Hoover, TA., Vodkin, MH., Williams, JC., (1992). *A Coxiella burnetii repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence*. J Bacteriol 174:5540–5548.
- Huijsmans, CJJ., Schellekens, JJA., Wever, PC., Toman, R., Savelkoul, PHM., Janse, I., Hermans, MHA., (2011). *SNP-genotyping of a Coxiella burnetii outbreak in the Netherlands*. Appl Environ Microbiol. doi:10.1128/AEM.02293-10. <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/AEM.02293-10v1>.
- Joulié, A., Laroucau, K., Bailly, X., Prigent, M., Gasqui, P., Lepetitcolin, E., Blanchard, B., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., Jourdain, E., (2015). *Circulation of Coxiella burnetii in a Naturally Infected Flock of Dairy Sheep: Shedding Dynamics, Environmental Contamination, and Genotype Diversity*. Applied and environmental microbiology, 81(20), 7253–7260. <https://doi.org/10.1128/AEM.02180-15>.

- Kennerman, E., Rousset, E., Gölcü, E., Dufour, P., (2010). *Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Vol 33, Issue 1, 37-45.
- Kersh, GJ., Wolfe, TM., Fitzpatrick, KA., Candee, AJ., Oliver, LD., Patterson, NE., Self, JS., Priestley, RA., Loftis, AD., Massung, RF., (2010). *Presence of Coxiella burnetii DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008*. Appl Environ Microbiol 76:4469–4475.
- Keshavamurthy, R., Singh, B. B., Kalambhe, D. G., Aulakh, R. S., & Dhand, N. K., (2019). *Prevalence of Coxiella burnetii in cattle and buffalo populations in Punjab, India*. Preventive Veterinary Medicine, 166, 16–20. doi:10.1016/j.prevetmed.2019.03.003.
- Kılıç, S., Çelebi, B., (2008). *Türkiye’de Coxiella burnetii’nin epidemiyolojisi*. Turk Hij Den Biyol Derg, 2008, 65(3):1-27.
- 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., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel B., (2006). *Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of Coxiella burnetii*. BMC Microbiol. 6, 2.
- Küçükale, Ö. F., Cengiz, S., Kılıç, S., Yıldırım, M., (2013). *Erzurum İlinde sığır abortlarında Coxiella brunetii’nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi*, Atatürk Üniv. Vet. Bil. Derg., 8 (3):224-228 s
- Lang, G.H., (1988). *Serosurvey of Coxiella burnetii infection in dairy goat herds in Ontario. A comparison of two methods of enzyme-linked immunosorbent assay*. Can J Vet Res. 52(1), 37-41.
- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme G M, Weinstein RA., (2003). *Q fever: a biological weapon in your backyard*. Lancet Infect Dis, 2003,3(11): 709–721.
- Marrie, E., TJ, Raoult D., (2005). *Coxiella burnetii genotyping*. Emerg Infect Dis 11:1211–1217.
- Marrie, T.J., Durant, H., Williams, J.C., Minte, E., Waag, D., (1988). *Exposure to parturient cats is a risk factor for acquisition of Q fever in maritieme Canada*. J Infect Dis. 158, 101-108.

- Maurin, M., Raoult, D., (1999). *Q fever. Clin Microbiol Rev.* 12(4), 518-553.
- Mcdade, JE., (1990). *Historical aspects of Q fever. In: Marrie TJ (ed) Q fever, vol 1, The disease.* CRC Press, Boca Raton".
- Meiklejohn, G., Reimer, LG., Graves, PS., Helmick, C., (1981). *Cryptic epidemic of Q fever in a medical school. J Infect Dis* 144:107–113.
- Mioni, M., Sidi-Boumedine, K., Morales Dalanezi, F., Fernandes Joaquim, S., Denadai, R., Reis Teixeira, W. S., Bahia Labruna, M., Megid, J., (2019). *New Genotypes of Coxiella burnetii Circulating in Brazil and Argentina. Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(1), 30. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010030>.
- Mori, M., Boarbi, S., Michel, P., Bakinahe, R., Rits, K., Wattiau, P., Fretin, D., (2013). *In vitro and in vivo infectious potential of Coxiella burnetii: a study on Belgian livestock isolates. PLoS One*, 8(6), e67622.
- 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.
- 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.
- Omsland, A., Cockrell, DC., Howe, D., Fischer, ER., Virtaneva, K., Sturdevant, DE., Porcella, SF., Heinzen, RA., (2009). *Host cell-free growth of the Q fever bacterium Coxiella burnetii. Proc Natl Acad Sci USA* 106:4430–4434.
- Omsland, A., (2012). *Axenic Growth of Coxiella burnetii. Adv Exp Med Biol.* 984, 215-229.
- Özbey, G., Kalender. H., Muz, A., (2009). *Q hummasının epidemiyolojisi ve teşhisi. Sağlık Bilimleri Dergisi.* 18(2). 100-110.
- Parola, P., Raoult, D., (2001). *Ticks and tick-borne diseases in humans: an emerging infections threat. Clin. Infect. Dis.* 32: 897–928.
- Perugini, A.G., Capuano, F., Esposito, A., Marianelli, C., Martucciello, A., Iovane, G., Galiero, G., (2009). *Detection of Coxiella burnetii in buffaloes aborted fetuses by IS111*

*DNA amplification: A preliminary report.* Research in Veterinary Science, 87(2), 189–191. doi:10.1016/j.rvsc.2009.01.005.

Peter, O., Dupuis, G., Peacock, MG., Burgdorfer, W., (1987). *Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of Coxiella burnetii antibody.* J. Clin. Microbiol. 25(6): 1063-7, 1987.

Philip, C.B., (1948). *Comments of the name of the Q fever organism.* Public Health Reports, 63, 58.

Piñero, A., Barandika, J. F., García-Pérez, A. L., Hurtado, A., (2015). *Genetic diversity and variation over time of Coxiella burnetii genotypes in dairy cattle and the farm environment.* Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 31, 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.006>.

Psaroulaki, A., Hadjicristodoulou, C., Loukaidis, F., Soteriades, E., Konstantinidis, A., Papastergiou, P., Joannidou, M.C., Tselentis, Y., (2006). *Epidemiological Study of Q Fever in Humans, Ruminant Animal and Ticks in Cyprus Using a Geographical Information System,* European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25: 576-586.

Racic, I., Spicic, S., Galov, A., Duvnjak, S., Zdelar Tuk, M., Vujnovic, A., Habrun, B., Cvetnic, Z., (2014). *Identification of Coxiella burnetii genotypes in Croatia using multi-locus VNTR analysis,* Veterinary Microbiology, 173, 340-347.

Raoult, D., Marrie, T., Mege, J., (2005). *Natural history and pathophysiology of Q fever.* Lancet Infect Dis 5:219–226.

Rodolakis, A., (2009). *Q fever in dairy animals.* Ann N Y Acad Sci 1166:90–93.

Santos, A.S., Tilburg, J.J., Botelho, A., Barahona, M.J., Nuncio, M.S., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H., (2012). *Genotypic diversity of clinical Coxiella burnetii isolates from Portugal based on MST and MLVA typing.* International journal of medical microbiology : IJMM, 302(6), 253–256. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.08.003>.

Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., (2003). *Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii.* Proc Natl Acad Sci U.S.A., 100(9), 5455-5460.

- Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Prigent M, Yang E, Joulie A, Thierry R, Rousset E., (2015). *Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of Coxiella burnetii*. Microbes Infect. 2015;17:789–94.
- Smoyer, J.H., (2006). *Prevalence of Q-fever Agent Coxiella burnetii in Ticks Collected from an Animal Shelter in Southeast Georgia*. Georgia Southern 62 Universty, USA.
- Spyridaki, I., Gikas, A., Kofteridis, D., Psaroulaki, A., Tselentis, Y., (1998). *Q Fever in the Greek Island of Crete: Detection, Isolation, and Molecular Identification of Eight Strains of Coxiella burnetii from Clinical Samples*, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36, No. 7, 2063–2067.
- Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Hornstra, H. M., Pearson, T., Szigeti, A., Dán, Á., Balla, E., Keim, P. S., Gyuranecz, M., (2014). *Genotyping of Coxiella burnetii from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes*. BMC veterinary research, 10, 107. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-107>.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, WL., (2006). *Establishment of a genotyping scheme for Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett 254:268–274. %U <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00036.x>.
- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü TAGEM/HSGYAD/13/AO7/P02/31 No’lu proje
- Tilburg, JJ., Rossen, JW., Van Hannen, EJ., Melchers, WJ., Hermans, MH., Boyenkamp, JVD., Roest, HJJ., Bruin, Ad., Nabuurs Franssen, MH., Horrevorts, AM., Klaassen, CHW., (2012). *Genotypic diversity of Coxiella burnetii in the 2007–2010 Q fever outbreak episodes in The Netherlands*. J Clin Microbiol 50: 1076–1078.
- Tissot Dupont, H., Amadei, MA., Nezri, M., Raoult, D., (2004). *Wind in November, Q fever in December*. Emerg Infect Dis 10:1264–1269".
- To, H., Htwe, K. K., Kako, N., Kim, H. J., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., (1998). *Prevalence of Coxiella burnetii Infection in Dairy Cattle with Reproductive Disorders*. Journal of Veterinary Medical Science, 60(7), 859–861. doi:10.1292/jvms.60.859.
- Toledo, A., Jado, I., Olmeda, A.S., Casado Nistal M.A., Gil H., Escudero, R., Anda, P., (2009). *Detection of Coxiella burnetii in Ticks Collected from Central Spain*. Vector Borne Zoonotic Diseases, 9(5): 465-8.

- Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Teknik Raporu, (2010). *Coxiella burnetii'nin kenelerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve PCR-RFLP ile saptanması*, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Teknik Rapor, 2010/3.
- Vellema, P., Van den Brom, R., (2014). *The rise and control of the 2007-2012 human Q fever outbreaks in the Netherlands*. Small Ruminant Research 118, 69-78.
- Vigil, A., Chen, C., Jain, A., Nakajima Sasaki, R., Jasinskis, A., Pablo, J., Hendrix, L.R., Samuel, J.E., Felgner, P.L., (2011). *Profiling the humoral immune response of acute and chronic Q fever by protein microarray*. Mol Cell Proteomics 10:M110 006304.
- Waag, D., Thompson, H.A., (2005). *Pathogenesis of and immunity to Coxiella burnetii*. In: Linder L.E., Lebeda F.K., Korch G.W. (eds) *Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism*. Humana Press, Totowa.
- Waag, D.M., (2007). *Coxiella burnetii: host and bacterial responses to infection*. Vaccine 25:7288–7295 .
- Willems, H., Jager C., Baljer G., (1998). *Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium Coxiella burnetii*. J Bacteriol 180:3816–3822.
- Williams, J.C., (1991). *Infectivity, virulence, and pathogenicity of Coxiella burnetii for various hosts*. In: Williams J.C., Thompson H.A. (eds) *Q fever: the biology of Coxiella burnetii*. CRC Press, Boca Raton.
- Winner S.J., Eglin R.P., Moore V.I., Mayon-White R.T., (1987). *An outbreak of Q fever affecting postal workers in Oxfordshire*. J Infect 1987; 14: 255–61.
- Woah Terrestrial Manual Code Online Access, <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/> (erişim 06.2022)
- Woldehiwet, Z., (2004). *Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis*. Research in veterinary science, 77(2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.09.001>.
- Yanmaz, B., (2021), *Erzincan, Erzurum ve Ağrı illerinde küçükbaş hayvan çiğ sütlerinde coxiella burnetii varlığının araştırılması*, Doktora Tezi, Atatürk Üni.
- Parın, U., (2011). *Sığır, Koyun Ve Keçi Sürülerinde Coxiella burnetii Yayılımının Saptanması*, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üni.

Zhang GQ., To H., Yamaguchi T., Fukushi H., Hirai K., (1997). *Differentiation of Coxiella burnetii by sequence analysis of the gene (com1) encoding a 27-kDa outer membrane protein*. Microbiol Immunol 41:871–877.

