



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2011-002

**SIĞIR, KOYUN ve KEÇİ SÜRÜLERİNDE *COXIELLA*
BURNETII YAYILIMININ SAPTANMASI**

Arş. Gör. Uğur PARIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA

AYDIN-2011

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2011-002**

**SIĞIR, KOYUN ve KEÇİ SÜRÜLERİNDE *COXIELLA*
BURNETII YAYILIMININ SAPTANMASI**

Arş. Gör. Uğur PARIN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN-2011

ÖNSÖZ

Q Ateşi Hastalığı, dünya çapında önemi olan *Coxiella burnetii* adı verilen riketsial bir organizma tarafından oluşturulan zoonotik bir hastalıktır. Ayrıca *C. burnetii*, potansiyel bir bioterörizm tehlikesi olarak görülmüştür. Centre for Diseases Control and Prevention tarafından Kategori B biyolojik ajanı olarak sınıflandırılmıştır. *C. burnetii* enfeksiyonu evcil hayvanlarda kronik ve hareketsiz bir seyir gösterir. Fakat enfeksiyon daha çok koyun ve keçilerde, daha az sıklıkla olmak üzere sığırlarda da görülmektedir ve genellikle infertilite ile birlikte diğer reproduktif bozukluklara yol açmaktadır. Enfekte olan gebe hayvanlar doğum sıvıları, plasenta, fetal membranlar, idrar ve dışkı yoluyla mikroorganizmayı çevreye yayarlar. İnsanlarda enfeksiyona yol açan hayvan kaynakları en çok çiftlik hayvanları; özellikle sığır, koyun ve keçilerdir ve bu hayvanlar *C. burnetii* için en iyi rezervuarlardır.

Patojen etkenin izolasyonu tanı için güvenilirdir, fakat bu yöntem zaman alıcı ve tehlikeli olabilmektedir; bu nedenle 3. seviye biyogüvenlik sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Biyolojik örneklerden *C. burnetii* izolasyonunda PCR metodu kullanışlı olmaktadır. Transpozon-like element ile yapılan bir PCR testi (trans-PCR) değişik örneklerden *C. burnetii* saptanmasında oldukça spesifik ve duyarlı bir metot olmaktadır. Ayrıca oldukça spesifik ve duyarlı Real Time PCR prosedürleri de geliştirilmiştir. IS 1111 geni hedef alınan Real Time PCR, süt tanklarında ve klinik örneklerde *C. burnetii* etkenlerinin DNA dilüsyonlarında hücre sayısı bakımından miktarının ve çoğalmasının saptanmasında kullanılmaktadır. SYBR Green I bazlı Real Time PCR, *C. burnetii* Nine Mile faz I'in antibiyotik duyarlılık testi için iyi bir alternatif metot olma yolundadır.

Araştırmamızda sığır, koyun ve keçilerde *C. burnetii* yayılımının farklı metotlarla belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilisel Araştırma Projeleri tarafından VTF-11017 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	1
1.2. Genel Bilgiler	1
1.3. Taksonomi	3
1.4. Epidemiyoloji	6
1.5. Bakteriyolojik Özellikler	9
1.5.1. Asidofilik Yaşam Şekli	10
1.5.2. Metabolik Mekanizma	11
1.5.3. Taşınma	11
1.5.4. Gelişimsel Yaşam Siklusu	12
1.5.5. Faz varyasyonu	14
1.5.5.1. Faz I ve Faz II Lipopolisakkaritlerin Yapısı	14
1.5.6. Genetik Organizasyon ve Lipopolisakkarit Biyosentezi	16
1.6. Genomik özellikler	18
1.7. DNA Tamir Mekanizmaları	19
1.8. Patogenezis	21
1.9. Q Ateşi Hastalığında İmmun Yanıt	23
1.9.1. Primer Q Ateşi Hastalığında Protektif İmmun Yanıt	23
1.9.2. Kronik Q Ateşi Hastalığında Defektif İmmun Yanıt	24
1.9.3. Q Ateşi Hastalığında Doğal Bağışıklık	25
1.9.4. <i>C. burnetii</i> Fagositozu	26
1.9.5. <i>C. burnetii</i> 'nin İntrasellüler Dolaşımı	27
1.9.6. Toll-like Reseptörler ve <i>C. burnetii</i> Sensörleri	28
1.9.7. Dendritik Hücreler	29
1.9.8. Sitokin Ağı ve <i>C. burnetii</i> Ölümü yada Replikasyonu	29

1.9.9. İnterferon Gamma	30
1.9.10. Makrofaj Deaktivatör Sitokinler	31
1.10. Klinik Bulgular	32
1.11. Tedavi	35
1.12. Korunma ve Kontrol	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. Gereç	37
2.1.1. Kan Örnekleri	37
2.1.2. Solusyonlar	37
2.1.2.1. TAE Elektroforez Buffer	37
2.1.2.2. Gel Loading Buffer (6 X)	37
2.1.2.3. Serum Dilüent (Vircell®)	38
2.1.2.4. IgG Pozitif Kontrol (Vircell®)	38
2.1.2.5. IgG Negatif Kontrol (Vircell®)	38
2.1.2.6. IgG Cut-Off Kontrol (Vircell®)	38
2.1.2.7. IgG Anti-Goat Konjugat (HRP) (Abcam®)	38
2.1.2.8. Substrat Solusyonu (Vircell®)	38
2.1.2.9. Stop Solusyonu (Vircell®)	39
2.1.2.10. Wash Buffer (Vircell®)	39
2.1.2.11. Fosfat Buffer Solusyonu (Vircell®)	39
2.1.2.12. IgG Pozitif Kontrol (Vircell®)	39
2.1.2.13. IgG Negatif Kontrol (Vircell®)	39
2.1.2.14. IgG Anti-Goat Konjugat (FITC) (Abcam®)	39
2.1.2.15. Mounting Medium (Vircell®)	40
2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	40
2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar	40
2. 1. 3. 2. MgCl ₂ , Hot Start II Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set	40
2. 1. 3. 3. Primerler	40
2. 1. 4. Elektroforez Cihazı	40
2. 1. 4. 1. Agarose Jel Hazırlanışı	41
2. 1. 4. 3. Etidyum Bromür	41
2. 1. 4. 4. Standart Suşlar	41
2. 2. Yöntem	41

2. 2. 1. Örneklerin Alınması	41
2. 2. 1. 1. Kan	41
2.2.2. ELISA Testi	42
2.2.3. IFA Testi	44
2. 2. 2. 2. Genotipik İdentifikasyon	46
2. 2. 2. 2. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	47
2. 2. 2. 2. 2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	48
2. 2. 2. 2. 3. Amplikonların Elektroforez Tankında Yürütülmesi	48
2. 2. 2. 2. 4. Görüntüleme ve Değerlendirme	49
3. BULGULAR	50
3.1. ELISA Bulguları	50
3.2. IFA Bulguları	50
3.3. PCR Bulguları	52
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ	62
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	75
TEŞEKKÜR	76

ÇİZELGELER

Çizelge 2. 1.	<i>Coxiella burnetii</i> genomunda transpozon benzeri tekrarlayan bölgede bulunan primer çiftleri	40
Çizelge 2.2.	ELISA testi değerlendirme tablosu	43
Çizelge 2.3.	Mastermiksin hazırlanma oranları	47
Çizelge 2.4.	Touchdown PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı	48
Çizelge 3.1.	<i>Coxiella burnetii</i> varlığının araştırılmasında kullanılan ELISA, IFA ve PCR testlerinin sonuçları	54

RESİMLER

Resim 2.1.	Çalışmada kullanılan ELISA test kiti	43
Resim 2.2.	Çalışmada kullanılan ELISA pleyti	43
Resim 2.3.	Çalışmada kullanılan IFA test kiti	45
Resim 2.4.	Çalışmada kullanılan IFA slaytı	45
Resim 2.5.	Çalışmada kullanılan DNA Ekstraksiyon kiti	46
Resim 3.1.	IFA negatif kontrol	51
Resim 3.2.	IFA pozitif kontrol	51
Resim 3.3.	IFA pozitif sığır serum örneği	52
Resim 3.4.	Sığır, koyun ve keçi serumlarında <i>C. burnetii</i> varlığı	53

1. GİRİŞ

1.1. Tarihçe

Q ateşi hastalığı, ilk olarak 1935 yılında Avustralya'daki mezbaha işçilerinde saptanmıştır. Derrick adlı patolog, yaptığı klinik muayeneler sonucu hastalığı “şüpheli ateş” olarak tanımlamıştır. Febril hastalardan toplanan idrar örnekleri, kobaylara enjekte edilmiştir. Bu deneysel infeksiyon sonucu kobaylarda splenomegali ve febris gelişmiştir. Deneysel infeksiyon sonucu kobayların dalaklarından etken izole edilememiştir. Daha sonra Burnet adlı araştırmacıya gönderilen dalak örneklerinden süzülebilir etkenler izole edilebilmiştir (Maurin 1999).

Avustralya'da bu araştırmalar olurken aynı zamanlarda da Cox ve Davis adlı araştırmacılar, Rocky Mountain Spotted Fever hastalığının etkenini araştırmaktaydılar. Nine Mile Creek bölgesinden toplanan kenelerden de etken, Cox ve Davis adlı araştırmacılar tarafından izole edilebilmiştir. 1938 yılının Mayıs ayında, Dyer adlı doktor, Montana'daki laboratuvarı ziyaret ettikten sonra febril hastalığa yakalanmış ve bunun sonucunda “Nine Mile serotipi” de ortaya çıkmış bulunmaktadır (Madariaga ve ark 2003).

1938 yılının Nisan ayında Burnet adlı araştırmacı, Q ateşi hastalığı ile infekte olan kobaylardan topladığı dalak örneklerini Dyer adlı araştırmacıya göndermiştir. Daha sonra Cox adlı araştırmacı, etkeni *Rickettsia diaporica* olarak isimlendirmiştir (Madariaga 2003). Bu özellik, ajanın porlardan kolayca geçebilmesi ve büyüklüğü esasına dayanmaktadır. Daha sonra hastalık etkeni, Cox ve Burnet anısına *Coxiella burnetii* olarak isimlendirilmiştir (Heinzen ve ark 1999).

1.2. Genel Bilgiler

Coxiella burnetii, artropodlarda ve memeli konakçılarda bulunan, obligat intrasellüler, gram negatif pleomorfik kokobasil bir bakteriyel etkindir. Bu mikroorganizma, insan ve hayvanlarda Q ateşi hastalığına yol açmaktadır ve ilk olarak Derrick adlı araştırmacı tarafından 1937 yılında Avustralya'daki mezbaha işçilerinin ateşli hastalıklarının teşhisi sırasında saptanmıştır. Q ateşi hastalığı, tüm dünyada yaygın olarak

seyreden, etkilenen bireylerde akut ateş ve grip benzeri semptomlara yol açan bir hastalıktır. Akut formdan daha az görülen kronik form ise daha çok endokarditis ve hepatitise yol açmaktadır ve bireyler için hayati tehlike arz etmektedir. Hastalık etkeninin konakçı dağılımının vahşi hayvanlarla birlikte koyun, keçi, sığır gibi evcil hayvanları da kapsaması da önem teşkil eden bir durum olmaktadır. Rezervuar spektrumunun geniş olması ve *C. burnetii* etkeninin çevresel şartlara olan özel direnci, hastalık kaynaklarının belirlenmesinin zor ve zahmetli olmasına yol açmaktadır. Daha da fazlası, düşük infeksiyöz doz, aerosol yayılma ve bireyler arasında kısa sürede salgın oluşturabilme yeteneğinden dolayı 1942 yılından itibaren etken potansiyel biyolojik silah olarak değerlendirilmiştir (Samuel ve ark 2003) ve günümüzde ise Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından zoonotik çoklu hayvan türü hastalığı olarak sınıflandırılmaktadır (Anonim).

Biyoterörizm için kullanılan biyolojik ajanlar, A, B ve C kategorisi içinde incelenmektedir. Sınıf A ajanlar, kolayca saçılabilir ve bireyden bireye taşınabilmektedir. Yüksek mortalite, panik ve sosyal yıkım aracı olarak kolayca kullanılabilirler ve bu ajanlardan korunmak için özel tedbirler gerekmektedir. Kategori B ajanlar ise yine kolay yayılma özelliğine sahip olmalarına karşın, yüksek morbidite ve düşük mortaliteye neden olmaktadır. Kategori C ajanlar ise, kolay elde edilebildikleri ve potansiyel olarak yüksek morbidite ve mortalite şekillendirdikleri için tercih edilmektedirler. Kategori A ajanlar arasında *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* bulunmaktadır. Kategori B ajanlar ise *C. burnetii*, *Brucella* türleri, *Burkholderia mallei* olarak nitelendirilmiştir. Kategori C ajanlar ise çoklu ilaç direnci gösteren *Mycobacterium tuberculosis*, *Nipavirus*, *Hantavirus*, Sarı ateş virusu ve kene kaynaklı hemorajik ateş virusları olarak bildirilmiştir. Q ateşi hastalığı, ideal biyolojik savaş ajanıdır ve havada kolaylıkla yayılabilir. Pnömoni ile şekillenen infeksiyon durumunda yüksek morbidite görülebilmektedir. Düşük mortalite ile seyreden inkapasitasyon ile çevreye herhangi bir zarar verilmemektedir (Thompson ve ark 1996).

İntrasellüler bakteriler arasında *C. burnetii*'nin özel bir durumu vardır. Hücre içi parazitizm açısından *Coxiella* etkenleri *Rickettsia* genusu ile aynı sınıf içinde bulunmasına rağmen farklı olarak sitoplazma içindeki parazitoforus vakuölü (PV) içinde yaşamını sürdürmektedir. *C. burnetii* ve filogenetik olarak ilişkisi bulunduğu *Legionella pneumophila* etkenleri aerosol primer olarak aerosol yolla taşınmaktadır, fakat *L. pneumophila* fagolizozomik füzyonu engelleyerek alkali ortamlarda yaşamını

sürdürebilirken, *C. burnetii* ise az miktarda da olsa daha asidik fagolizozomal ortamlarda etkinliğini sürdürebilmektedir. Bu özel biyolojik yuvalar etkenleri hidrolitik enzimlerden, bakterisidal faktörlerden, oksijen ve nitrojen radikallerinden, ayrıca asidik pH'dan (~ 4.8) koruduğundan dolayı birçok bakteri için iyi bir üreme ortamını oluşturur (Vogel ve ark 2004).

Standart tekniklerin yetersiz ve genetik manipulasyonların olanaksız olmasından dolayı *C. burnetii*'ye ait moleküler olayların anlaşılması zaman alıcı olmuştur. Obligat hücre içi yaşam siklusu, sellüler lokalizasyon, düşük üreme düzeyi, lizis olayından çok hücre içinde persiste olarak gelişme eğiliminden dolayı *C. burnetii* etkeni için yeni transformasyon teknikleri geliştirilememiştir. *C. burnetii*'ye ait genlerin fonksiyon ve regülasyonlarının belirlenmesi için yapılan ilk uygulamalarda *E. coli* etkenine entegre edilme gibi heterolog klonlama sistemleri kullanılmıştır. Korunan genler, yüzey proteinleri ve stres genleri karakterizasyonda belirlenmek için araştırılan komponentler olmuştur. Otonom replikasyon sekans (ars) geninin identifikasyonu ile birlikte kromozomal orjin ve *E. coli*'deki plazmid replikasyon mekanizması ortaya çıkarılmıştır, böylece yeni genetik manipülasyonların geliştirilmesinin önü açılmıştır. *C. burnetii* Nine Mile suşuna ait korunan genlerin sekanslanmasından sonra ise filogenetik sınıflandırma açısından daha kapsamlı uygulamaların yapılabilmesi hedeflenmektedir (Suhan ve ark 1996).

1.3. Taksonomi

Obligat intrasellüler yaşam siklusu ve artropodlarla olan ilişkisi nedeniyle *C. burnetii*, ilk olarak Rickettsia ve Rochalimea (Bartonella) generi ile Rickettsiaceae familyasının Rickettsiae takımı içinde bulunan Proteobacteria'ların α -1 subdivizyonunda sınıflandırılmıştır (Wyrzykowski ve ark 2003). Genom karşılaştırmaları ve 16S rRNA sekans analizi çalışmaları sonucunda, *C. burnetii*'nin Rickettsia generi ile akrabalık derecesinin uzak olduğu ve Legionella, Francisella ve Rickettsiella cinsleri ile daha yakın akraba olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca bu bilgiler, yüksek homojenite düzeyini ve Coxiella generisinin tek türlerden oluştuğunu desteklemektedir (Atzpodi ve ark 1994).

Köken olarak *C. burnetii* suşları, izolasyon kaynaklarına, coğrafik orjinlerine ve gösterdiği klinik belirtilerin çeşidine göre tanımlanmaktadır. Lipopolisakkarit bant dizisi karşılaştırılması ve plazmid belirlenmesi gibi fenotipik ve genomik uygulamalarla bu

organizmalar arasındaki ayırımın ortaya konulması amaçlanmıştır (Stein ve ark 2000). Coxiella etkenlerine ait QpH1, QpRS, QpDG, QpDV ve Çin kökenli belirlenemeyen plazmid olmak üzere şu anda 5 farklı plazmid tipi tanımlanmıştır (Minnick ve ark 1990). İlk tanımlanan plazmid, 36kb büyüklüğünde olan QpH1'dir ve *C. burnetii* Nine Mile RSA493 suşundan izole edilmiştir. Bu plazmidin sekanslanması sonucu qsopAB, roa307, cbhE lokusları identifiye edilmiştir (Lautenschlager ve ark 2000). 39 kb büyüklüğündeki QpRS plazmidini ise köken olarak keçiden alınan bir atık materyalinden izole edilen *C. burnetii* Priscilla Q177 suşundan identifiye edilmiştir ve QpH1 plazmidine göre daha fazla korunan ve nadir görülen sekansları içermektedir. 51 kilobaz büyüklüğünde olan QpDG plazmidini ise rodentlerden izole edilen *C. burnetii* Dugway 5J108-111 suşundan identifiye edilmiştir. Ayrıca bu suşun da Gine domuzlarında avirulant olduğu ortaya konulmuştur. 33.5 kb büyüklüğünde olan QpDV plazmidini Rusya kökenli ve insan pnömonilerinden izole edilen Q321 ve inek sütünden izole edilen Q1140 suşları olmak üzere iki farklı kaynaktan identifiye edilmiştir. QpDV plazmidinde hem özgün olan hem de QpH1 ile homolog olan sekans bölgeleri belirlenmiştir. Kros hibridizasyon deneylerinde ise bu dört plazmidin, plazmid içermeyen *C. burnetii* Scurry Q217 suşunda olduğu gibi aynı 16-kilobaz fragmenti içerdiği ve bu fragmentin çekirdek fragment olduğu bildirilmiştir (Valkova ve ark 1995).

C. burnetii etkenlerinden izole edilen genomik DNA'ların RFLP (restriction fragment length polymorphism) ile analiz edilmesi sonucu, gruplandırma açısından yüksek derecede heterojenik bantların elde edildiği bildirilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda, değişik kaynaklardan izole edilen 36 adet *C. burnetii* etkeni BamHI, EcoRI, HindIII enzimleriyle birlikte RFLP tekniği ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda da 6 farklı genomik grup belirlendiği bildirilmiştir (Baere ve ark 2006). İlk üç grupta bulunan izolatların başlıca akut infeksiyonlarla ilişkili bulunduğu ve QpH1 plazmidini barındırdığı tespit edilmiştir. QpRS plazmidinin ise grup IV'deki suşlarda bulunduğu ve bu grupta incelenen serotiplerin kronik Q ateşi hastalığına yol açtığı tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda da *C. burnetii* etkeni RFLP analizi ile birlikte tek lokus sekanslama yöntemi ile de saptanmıştır (Nyugen ve ark 1999).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Avrupa, Kanada, Birleşik Devletler ve Japonya'dan toplanan 173 *C. burnetii* izolatu Multispace sekans tiplendirmesi yöntemi ile incelendiği ve bu yeni metodun farklı genlerin internal bölgelerinin nükleotid sekanslama yöntemi ile karşılaştırıldığında benzer genleri yüksek oranda tespit edebildiği bildirilmiştir

(Glazunova ve ark 2005). Bu yeni metotta her bölge için belirlenen sekanslardaki farklılıklar, allelik derecesine göre saptanmış ve organizmanın allelik profilinin ortaya çıkarılması açısından önemli bulunmuştur. Sekans tiplendirilmesinin ve 10 kromozomal bölgenin dağılımı temel alındığında 3 adet farklı monofilogenetik grup ile birlikte birkaç adet altgrup da tanımlanmıştır. Coğrafik özelliklerin ve sekans tipi dağılımının korelasyonu olarak dünyada bulunan suşların filogenetik ilişkileri de ortaya konulmuştur. QpRS plazmidi içeren suşlar akut, QpDV plazmidi içeren suşlar ise hem akut, hem de kronik infeksiyonlar ile ilişkili olarak bulunmuştur. Genetik dağılımın patojenik faktörler, filogenetik durum ve bakteriyel virulans özellikleri ile birlikte korelasyonunun ortaya konulması için umut teşkil eden bir diğer teknik ise komparatif genom hibridizasyon tekniğidir. Tek yada birden çok açık okunan bantların negatif hibridizasyonu olarak tanımlanan genetik polimorfizm, mikroarray çipleri ile belirlenerek *C. burnetii* Nine Mile suşu açısından bütün genetik fragmentler ortaya çıkarılmış durumdadır (Brennan ve ark 2004). Tiplendirilen 20 adet *C. burnetii* izolatının RFLP ile gruplandırılması ve komparatif genom hibridizasyonu ile doğrulanması sonucu grup VII ve grup VIII olmak üzere 2 yeni genomik grup sınıflandırılmıştır. Glazunova ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmadaki sonuçlara uyumlu olarak grup izolatlarının dünyaca yayılımındaki düşük genetik polimorfizm özelliği ile izole edilen suşların antik özelliği olduğu ortaya konmuştur. İlk izolasyonundan itibaren suşların genetik özelliklerinde kısıtlı değişiklik olması da bu durumu desteklemektedir. Elde edilen verilerde grup I izolatların, diğer filogenetik grupların atası olduğu da bildirilmiştir (Grieshaber ve ark 2006).

1.4. Epidemiyoloji

Coxiella burnetii sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanları, yabani hayvanlar, keneler ve insanları içeren geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir. Doğal siklusunu kene ve kemiricilerde geçirdikten sonra koyun, keçi, sığır, köpek, kedi gibi evcil hayvanları infekte ederler (Echaniz ve ark 1992). Zoonotik bir infeksiyon olan Q ateşinin epidemiyolojisinde, etkenin kurumaya ve diğer fiziksel faktörlere yüksek direnç nedeniyle, konakçı hücresi dışında uzun süre canlı kalmasının önemli olduğu belirtilmiştir. Etkeni içeren aerosol yüksek derecede infekte olduğu için kuru hava, kuvvetli rüzgar ve infekte aerosolün yayılması arasında yakın bir ilişki olduğu ve bu nedenle etkenin infekte hayvanlarla direkt ilişkisi olmayan duyarlı konakçılara da bulaştığı bildirilmiştir (Ripoll ve ark 1997).

İnfekte gebe hayvanların plasenta ve fetal sıvıların çok miktarda (109/gr) etken içerdiği, doğumu izleyen haftalarda canlı mikroorganizmaların 150 güne kadar toprakta bulunduğu ve ineklerin doğum sonrasında etkeni 32 aya kadar sütleri ile çıkardıkları belirtilmiştir. Seropozitif ineklerin potansiyel bulaştırıcı olarak düşünülmesi gerektiği ve infekte sığırların Q ateşinin epidemiyolojisinde büyük öneme sahip olduğu vurgulanmıştır. Doğum öncesi enfeksiyona yakalanan kadınların süt ve plasentalarında da çok miktarda *C. burnetii* saptanmıştır (Diaz Morant ve ark 1995).

Pastörize edilmemiş süttten hazırlanan peynir gibi süt ürünlerinin 1-2 ay süreyle canlı mikroorganizmaları barındırabileceği, 63°C'de 30 dakika ya da 85-90°C'de birkaç saniye süreyle ısıtma işleminin etkeni öldürmeyebileceği, ancak 74°C'de 15 saniye süreyle uygulanan pastörizasyon işlemi sonucu etkenin kıa sürede inaktive olduğu bildirilmiştir (Sixl ve ark 1987).

İnfekte sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarıyla temasın, enfeksiyonun insanlara bulaşmasında en öernli risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Hayvanlarda saptanan bazı Q ateşi olgularında, özellikle infekte gebe kedilerin de bulaşmada rol oynadığı gösterilmiştir. İnfekte partiküllerin solunması, enfeksiyonun insanlara bulasrnasmda en öernli yoldur (Von ve ark 1993). *Coxiella burnetii*'nin insan plasentasından izole edilmesine ve laboratuvar farelerinde veneral yolla bulaştığı saptanmasına karşın doğal koşullarda insan ve hayvan türlerinde Q ateşinin veneral yolla bulaşıp bulaşmadığı tartışmalıdır. Deri ve mukozalardaki sıyrıklardan ve konjunktiva yoluyla da etkenin bulaştığı bildirilmiştir. Bazı araştırmalarda kenelerin de bulaşrnada öernli rol oynadığı saptanmıştır. İnsandan insana bulaşma son derece seyrek (Sanzo ve ark 1993).

Q ateşi enfeksiyonunun büyük kısmı, özellikle hayvanların et, süt ve süt ürünleriyle yakın temasta olan veteriner hekimler, mezbaha işçileri, laboratuvar ve çiftlik çalışanları oluşturmaktadır. Ayrıca infekte ruminantlarla temas halinde olan kişilerin bulunduğu yerleşim yerlerinde Q ateşi salgını riskinin bulunabileceği belirtilmiştir (Marrie 1990).

Sığır, koyun ve keçiler, Q ateşi hastalığının primer rezervuarlarıdır. *C. burnetii* etkenleri, infekte hayvanların uterus ve meme bezlerinde lokalize olmaktadır. Fakat *C. burnetii* ise memeliler dahil kuşları ve artropodları da infekte edebilmektedir. Çeşitli

hayvan rezervuarlarının olmasının önemi, daha önce şekillenen salgınların niteliklerine bakılarak anlaşılabilir. 1999'dan 2004'e kadar 12 değişik ülkede toplam 18 adet salgın bildirilmiştir. Altı adet salgın koyunlardan, üç adet salgın keçilerden, bir adet salgın keçi gübresine maruz kalınmaktan, bir adet salgın koyun gübresine maruz kalınmaktan, bir adet salgın ise vahşi hayvanlara maruz kalınmaktan, bir adet salgın kedi ve köpek kaynaklı olarak ortaya çıkmıştır. İki adet salgının ise kaynağı bilinmemektedir (Punda-Polic ve ark 2005).

Hayvanlarda Q ateşi infeksiyonu genel olarak asemptomatik olarak seyretmektedir, fakat abort, ölü doğum ve düşük canlı ağırlıklı hayvan vakaları da sıklıkla görülebilmektedir. Aborte fetuslar, genel olarak normal görünümündedir. Abort yüzde oranları % 3'ten % 80'e kadar değişmektedir. En yüksek oranlar ise keçi sürülerinde görülmektedir. İnfekte plasentalarda intrakotiledonar fibröz kalınlaşma ve eksudat birikimi belirlenmiştir. Koyun sürülerine nazaran sığır ve keçi sürülerinde süt ile yayılma daha uzun süren ve sıklıkla görülen bir durumdur. Koyunlar ise vajinal akıntılarında etkeni daha fazla miktarda ve daha uzun süre yayarlar. Keçilerde ise doğum öncesi ve sonrasında dışkı ile etkenin atılması sıklıkla görülmektedir. Bu süreçte ise etkenin atılma dönemi ortalama 20 gün olmaktadır. İnfekte inekler ise etkeni sütle 32 aya kadar atabilmektedirler (Literak ve ark 1994). *C. burnetii*'nin yüksek konsantrasyonları, infekte plasentada, doğum sırasında meydana getirilen aerosollerde bulunabilmektedir. Ayrıca bu kontamine aerosollerin inhalasyonu da insanlarda infeksiyona neden olabilmektedir. (Tselentis ve ark 1995).

Sanford ve arkadaşları (1994), beş adet keçi sürüsünde meydana gelen atık olaylarının sadece yeni doğum yapmış üç adet keçiden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bütün keçiler aynı yerde barındırılmışlardır. İnfeksiyona maruz kalındıktan 21 gün sonra, her sürüde abort vakaları, gebe hayvanlarda % 20'den % 46'ya kadar artmış ve immunohistokimyasal analizler sonucu organizmanın hem yüzeyde, hem de koryoallantoik membranda mevcut kaldığı gözlenmiştir. İnfekte koyunların plasentasında her dokuda ortalama 10^9 bakteriyel etken tespit edilmiştir. Ölü doğum oranı ise infekte kedilerde % 70 oranında görülmüştür. İnfekte olmayan kedilerde ise ölü doğum oranı % 10 olarak belirlenmiştir. Sütçü inekler de Q ateşi hastalığını yayma açısından önemli rezervuarlardır. Vahşi ortam ise sığırların infekte olmasında önemli bir etken olabilmektedir, fakat geniş çaplı sığır sürülerinde infeksiyonun kaynağı bilinmemektedir (Stoker ve ark 1995).

Yaban tavşanları ve normal tavşanlar vahşi hayvanlar arasında birçok infeksiyon türünü yapılarında barındırabilmektedirler. Webster ve arkadaşlarının (1995) Oxfordshire’da yaptıkları çalışmada, % 7-53 oranında kahverengi yaban ratlarının (*Rattus norvegicus*) *C. burnetii* açısından seropozitif olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda da ratların kediler açısından potansiyel bir av olması sonucu kedilerin de infekte olduğu kanısına varılmıştır.

İnfekte keneler, muhtemelen *C. burnetii*’nin yaşam siklusunu devam ettirebilmesi için en önemli rezervuar olmaktadır. İnfekte keneler, tavşan, keçi, sığır, koyun ve diğer birçok hayvanda kan emici olarak bulunabilmektedirler. Kenelerin bir yerden bir yere taşınmasında da kuşların rolünün önemli olduğu bildirilmiştir. Q ateşi hastalığının insanlarda direkt olarak yayılmasında da kuşların rolü olduğu Güney Fransa’da aerosollerden kaynaklanan bir salgında bildirilmiştir. Etkenin güvercin dışkılarından izole edildiği ve bu şekilde insanlara aerosol yolla yayıldığı bildirilmiştir. Bazı ülkelerde, vahşi yada evcil hayvanlar ile temas eden insanlarda hastalığın daha fazla görüldüğü, temas riski olmayan bölgelerde ise daha az Q ateşi infeksiyonu görüldüğü bildirilmiştir (Webster ve ark 1995).

1.5. Bakteriyolojik Özellikler

C. burnetii etkeni obligat intrasellüler, hareketsiz, ökaryotik konakçı hücrelerde yüksek sayıda replike olma özelliğine sahip pleomorfik kokobasiller halinde görülmektedir. Bölünebilme zamanı 20 saatten 45 saate kadar değişmektedir. (Baca ve ark 1983). Diğer gram negatif etkenler ile dış membran proteinleri, lipopolisakkarit ve peptidoglikan varlığı açısından benzer hücre membranı yapısına sahip olmasına rağmen Gram boyamada güvenilir bir boyanma karakteri göstermemektedir. *C. burnetii* etkenleri, Gimenez boyama metodu ile iyi boyanmaktadır ve tanıda bu yöntemden sıklıkla yararlanılmaktadır (Gimenez ve ark 1964).

C. burnetii etkenleri doğal olarak aerosol yolla yayılır ve primer durumda parazitik olarak alveoler makrofajlar ve monositlerce hücre içine alınmaktadır. Bu endositik veziküller, normal siklus çerçevesinde bakteriyel etkenlerin elimine edildiği fagolizozomlara dönüşmektedir. Birçok invaziv bakteriyel etken, lizis yada fagositik veziküller yoluyla endositik eliminasyon mekanizmasından kaçabilmektedir. Fagozom

kontrolünün bakterinin eline geçmesi yada fagolizozomal füzyon olayının inhibisyonu da bakterilerin hücre içi yaşamlarını sürdürebilmelerini sağlamaktadır (Meresse ve ark 1999). *Coxiella* spp. etkenlerinin hücre içi yaşam siklusunun başlamasından sonra vakuoller, hacim olarak artar ve fagozomal vakuoller oluşur. Bu vakuoller, konak hücrenin neredeyse tüm sitoplazmik alanını kaplayabilmekte olup aynı zamanda konak hücrenin yaşamını devam ettirebilmesine de olanak sağlamaktadır. Bu fagozomal vakuoller, asit fosfataz, katepsin D ve lizozomal proteinler gibi sekonder fagolizozom karakterini taşıdıkları için, immun sistem hücreleri tarafından antijen olarak tanınma özelliklerini büyük oranda kaybedebilmektedir. Fagozomların olgunlaşması, invaziv bakterinin hücre içi ortamda üreyebilme yeteneğine bağlıdır. Örneğin, *Coxiella burnetii* ile filogenetik akrabalığı bulunan *L. pneumophila* etkeni, fagositik mekanizmayı bloke edebilir ve endositik aktivitede düşüşe yol açabilmektedir. *Legionella* etkenlerinin vakuollerde yaşamını sürdürebilmeleri de *imc/dot* genleri tarafından kodlanan efektör moleküllerin sentezlediği Tip IV sekresyon sistemi sayesinde düzenlenmektedir (Vogel ve ark 1999). *C. burnetii* etkeni de hemen hemen bütün *imc/dot* genlerini yapısında bulundurmaktadır ve fagolizozomal füzyonu etkisiz hale getirebilmektedir. Metabolik olarak aktif olan fagozomal vakuollerin de ölü bakterilerden farklı olarak fagolizozomal füzyon etkinliğini düşürdüğü bildirilmiştir (Sexton ve ark 1995).

1.5.1. Asidofilik Yaşam Şekli

Fagozomal vakuollerde *C. burnetii* etkeni düşük pH ortamında yüksek derecede aktive olmaktadır, ayrıca besin taşınması ve substrat metabolizması da indüklenmektedir. Membranın içinden aktif taşınmanın sağlanması için nötral bir sitoplazmik pH gerekmektedir ve bu ortam, diğer aktif yada pasif mekanizmalarla sağlanabilmektedir. Bazı sodyum/proton değişiminde görevli olan ve temel pI proteinini içeren moleküllerin hücre içi homeostazisi sağladığı bildirilmiştir. Bakteriyel sitoplazma ve fagolizozom ortamındaki pH değişikliği genel olarak besin taşınmasını arttırmaktadır. Bu olayda da proton stimülatörleri rol oynamaktadır (Ho ve ark 1995). Yüksek derecede adaptif yaşam şeklinin adenosin trifosfat (ATP) tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Asidik ortam altında ATP etkinliğinin hücresel bağlamda artması, *C. burnetii* için esansiyel bir substrat olan glutamatla birlikte oksidatif fosforilasyon sayesinde olmaktadır. Bu sebepten dolayı *C. burnetii* etkeninin, oksijen transportunun yoğun olduğu dokulara affinite gösterdiği düşünülmektedir. ATP açısından yoğun olan ortamlarda pH derecesi 7.0 seviyesinde

sabitlenir, yeni bir ATP molekülü hücre içine tekrar girinceye kadar metabolik aktiviteler hücre dışında dengeli olarak devam eder. Bu durumun sonucunda da *C. burnetii* etkenlerinin üremeleri kolaylaşmaktadır. Peptidoprolil izomeraz (CbMip) ve disülfid oksidoredüktaz gibi moleküllerin eşliğinde *C. burnetii* etkeninin üremesi için elverişli bir ortam sağlanmış olmaktadır. Bazı çalışmalarda *C. burnetii* replikasyonu ve fagozomal vakuol maturasyonu açısından interferonların ve tümör nekrozan faktörlerin (TNF) inhibe edici özellikleri bildirilmiştir. Oksijen radikallerinin varlığı ile birlikte nitrojen radikallerinin üretiminin düzenlenmesinin artmasının, *C. burnetii*'nin vakuollerdeki replikasyonunu kontrol eden bir özellik olduğu bildirilmiştir (Howe ve ark 2002). Yüksek oksidatif aktiviteden korunmak için *C. burnetii* etkenlerinin enzim sistemleri bulunmaktadır. Süperoksit anyonlarının detoksifikasyonu, SodA ve Sod C olmak üzere sitoplazmada bulunan iki adet süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Daha sonraki aşamada ise katalaz enzimi tarafından ortamdaki hidrojen peroksit, oksijen ve suya indirgenmektedir. Genomik analizler sonucu alkilhidroksiperoksidaz genlerinin katalaz aktivitesini başlattığı belirlenmiştir. Bu bulgular sonucu *C. burnetii* ile infekte makrofaj ve nötrofillerin oksidatif aktiviteyi başlatamadıkları bildirilmiştir (Miller ve ark 2002).

1.5.2. Metabolik Mekanizma

C. burnetii etkeninin biyosentetik kapasitesi oldukça geniştir ve trikarboksilik asit siklusu, ayrıca pentoz-fosfat yolu ile şekeri kullanabilmektedir. Bu mekanizmada ise bazı tam aminoasitlerin, lizin ve triptofan gibi anahtar enzimlerin rol oynamaması da ilginç bir özelliktir. Araştırmalarda sonraki basamakların konak hücrenin metabolik faaliyetleri ile yürütüldüğünü göstermiştir. ATP'den sağlanan enerji, oksidatif fosforilasyon ve elektron taşıma sistemi ile oluşturulmaktadır. Purin ve pirimidin nükleotid metabolizması sentez aşamaları, yağ asidi, fosfolipid, kofaktör sentezi de sekans sıralamalarına dayanmaktadır. İzoprenoid, izopentil difosfat, hücre duvarı biyosentezinde görev almaktadır (Seshadri ve ark 2003).

1.5.3. Taşınma

Genom redüksiyonu, metabolik kapasiteyi de içermekle birlikte intrasellüler bakteriler arasında yaygın görülen bir olaydır ve konakçı faktörleri ile birlikte değişim

gösterir. Taşıma mekanizmalarının gelişimi, besin maddelerinin ve prekürsörlerin ortamda bulunup bulunmamasına göre değişmektedir. *C. burnetii* etkeni, glikoz ve ksiloz için iki adet proton bağımlı taşıma sistemine, onbeş adet aminoasit taşıma sistemine ve 3 adet peptid taşıyıcısına sahiptir. Purin ve pirimidinlerdeki bozulmamış sentez mekanizmalarına rağmen, purin nükleozidleri aktif taşıma ile pirimidin nükleozidleri ise difüzyon olayı ile sentezlenebilmektedir. *C. burnetii* etkeni, diğer asidofilik bakterilerde olduğu gibi hücre içi pH homeostazisini nötral dengede tutmaya çalışmaktadır. Hücresel taşıma sistemini oluşturan genlerin büyük çoğunluğunu, konak defensinlerine ve antibiyotiklere karşı direnci meydana getiren genler oluşturmaktadır. *C. burnetii*, diğer tipik intrasellüler bakterilerde olduğu gibi ATP'yi konakçıdan karşılayacak olan enzimlere sahip değildir. ATP maddesi fagolizozomlarda nadiren bulunmaktadır ve ATP/ADP değişim mekanizması spesifik ortamlarda *C. burnetii* için uygun olamayabilmektedir (Veras ve ark 1995).

1.5.4. Gelişimsel Yaşam Siklusu

C. burnetii etkeni için en önemli özellikler, fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı oldukça dirençli olmasıdır. Bu özellik, etkenin doğada sürekli canlı ve infeksiyöz halde kalmasını sağlamaktadır. Bu stabil özelliğin temelinde ise bifazik yaşam siklusu içerisinde bakterinin değişik hücre tipleri ile persistens olarak meydana gelmesi bulunmaktadır. *C. burnetii* etkeni, ökaryotik hücrelerin fagolizozomal bölümlerinde iki farklı hücre tipinde görülebilmektedir ve bu özellik ilk kez Davis ve Cox tarafından 1938'de bildirilmiştir. McCaul ve Williams da (1981) vejetatif formasyon ve sporogenezis şeklindeki gelişimsel yaşam siklusunu ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacılar, küçük hücre varyantı (SCV), ve geniş hücre varyantı (LCV) olmak üzere iki farklı hücre tipi belirlemişlerdir. Bu hücre tipleri dansitedeki değişim ve morfolojik işaretleyiciler sayesinde belirlenebilmektedir SCV'ler tipik olarak 0.2-0.5 µm çapında ve çomak şeklinde ve yoğun kromatin iplikçikleriyle birbirine bağlı intrasitoplazmik membrandan oluşmuştur. Bu hücre formu, ısı şokuna, basınca, ultrasonik vibrasyonlara, ozmatik şoka ve oksidatif strese dayanıklı olmaktadır. LCV'ler ise daha büyüktür, büyüklükleri 1 µm'yi geçer ve daha pleomorfik yapıda görülmektedirler, ayrıca kromatinleri dağınık ve filamentöz halde bulunmaktadır. Tipik gram negatif bakterilerde olan eksponansiyel fazı içeren sitoplazmik membran, periplazmik boşluk ve dış membran komponentlerini yapılarında barındırmaktadır (McCaul ve ark 1991).

C. burnetii'nin yaşam siklusunu anlayabilmek için, fagozomal vakuollerdeki morfolojik hücre diferansiyasyonunu düzenleyen genler identifiye edilmiştir. SCV ve LCV hücre türleri arasındaki farklılıklar immunoblotting, yüzey iyonizasyonu ve iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi yöntemleri ile ortaya konmuştur. Bu metodlarla 29 kDa büyüklüğündeki P1 dış membran proteini identifiye edilmiştir. P1 proteini anyon selektif porin olarak görev yapmaktadır. Porin komponenti, 7.4 pH derecesinde açık olarak bulunur ve ekstrasellüler ortama göre pH'nın nötr kalmasını sağlar. Düşük pH derecelerinde ise fagolizozomlarda olduğu gibi porin aktivitesi değişir ve porinler genelde kapalı olarak kalmaktadır. Porinlerin açık kaldığı düşük pH derecesinde ise kompanzasyon, *C. burnetii* için yararlı bir karbon kaynağı olan glutamat ile sağlanır (Varghees ve ark 2002).

Gen ekspresyonu profili analizleri sonucu LCV ve SCV spesifik genlerin, P1'in, alternatif sigma faktörü rpoS'in ve hcbA'nın infeksiyondan sonra erken dönemde meydana getirildiği belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalara göre P1 geninin besin alımındaki rolü, asidik fagolizozomlarda belirlenmiştir. *Escherichia coli* bakterisinde, latent dönemden üreme dönemine geçişteki gen regülasyonu Rpo geni tarafından düzenlenmektedir. LCV hücre tipindeki Rpo'lar ise üreme regülasyonundan ziyade intrasellüler ve ekstrasellüler ortama uyum sağlanması açısından *C. burnetii* etkeninde görev almaktadır. Diferansiye gen ekspresyonuna verilebilecek bir örnek ise uzama faktörü genleridir. EF-Ts (tsf) ve Ef-Tu (tufB) genleri LCV hücre tipleri için translasyonel element olarak belirlenmiştir. Bu genler, aminoasit tRNA ribozom bağlanmasını, transkripsiyonu, ve *C. burnetii* için stres cevabı olaylarını aktive edebilmektedir (Abdelrahman ve ark 2005).

SCV spesifik bir gen olan hcbA ise Hq1 tarafından kodlanmaktadır ve bu komponent, Chlamydia türlerinde bulunan histon benzeri protein ile yağı bakımından korelasyon göstermektedir. Hq1, daha çok LCV ve SCV diferansiyasyonu sırasındaki yoğun nükleoid formasyonundan sorumludur. SCV proteini olan scvA'nın fonksiyonu ise tam olarak anlaşılamamıştır. Çünkü bu genin in vitro ortamdaki DNA bağlanma aktivitesi, kromozom stabilizasyonu ve topolojik DNA'nın indüksiyonu, dolayısıyla LCV hücrelerinin SCV hücrelerine diferansiyasyonunda farklılıklar gözlenmektedir (Abdelrahman ve ark 2005).

C. burnetii etkeninin morfolojik diferansiyasyonu *Chlamydia spp.* ve *Legionella spp.* türleri ile benzerlik göstermektedir. Hem SCV'ler, hem de Klamidyal elementer

komponentler (EB) yoğun kromatin ipliklerini içermektedir. Bu yapılar, metabolik olarak daha az aktiftirler ve ekstrasellüler yaşama göre adaptasyon sağlamışlardır. *C. burnetii* ile karşılaştırıldığında, *L. pneumophila* etkeni amipsi formlarda diferansiyasyona gitmektedir. Kist benzeri yada olgun intrasellüler form (MIF) SCV ile karşılaştırılabilir durumdadır ki her iki hücre varyantı intrasellüler büyüme boyunca dış ortam koşullarına göre stabil kalmaktadır. *C. burnetii* için ifade edilen bifazik yaşam tarzı 2 farklı fazı içermektedir. Birinci faz olan replikatif fazda metabolik olarak aktif durumdaki LCV hücreleri ve diğer fazda ise infeksiyon siklusunda çeşitli adaptasyonların görüldüğü SCV hücreleri olmaktadır (Garduno ve ark 2002).

1.5.5. Faz Varyasyonu

1.5.5.1. Faz I ve Faz II Lipopolisakkaritlerin Yapısı

C. burnetii etkeninde antijenik varyasyonlar konak hücreye bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Embriyolu tavuk yumurtası veya hücre kültürlerindeki pasajlar sonucunda bakteriyel popülasyonların Enterobacteriaceae familyasındaki etkenlerde olduğu gibi virulent fazdan (Faz I) avirulent faza (Faz II) geçtikleri görülmüştür. *C. burnetii* Faz I etkeninde lipopolisakkaritler tam olarak oluşmaktadır ve bakteriye yüksek derecede infektivite kazandırmaktadır. Bu etkenler insanlar, hayvanlar ve artropodlarda da görülmektedir. Faz varyasyonu, tek aşamada gerçekleşen bir olay olmayıp, avirulent faza geçiş sırasında bir ara faz da bulunmaktadır. Faz II etkenlerde sadece gövdeden ibaret ve yapısı bozulmuş lipopolisakkarit formu belirlenmiştir. Bu formda ayrıca yüzey proteinleri ve hücre dansitesi de yapısal olarak farklılık göstermektedir (Toman ve ark 1998).

O antijenik polisakkaritleri galaktozaminuronil- α -(1,6)-glukozamin disakkarit [GalU- α -(1,6)-GlcN] ve L-dihidroksistreptoz [3-C-(hidroksimetil)-liksoz] moleküllerinden oluşmuştur. O antijeninin kesin ünit membranı tam olarak belirlenememiştir, fakat β -D-virenoz ve L-dihidroksistreptoz komponentlerini içerdiği tahmin edilmektedir (Toman ve ark 1998). Lipopolisakkarit yapısındaki suşlar arası antijenik varyasyonlar bant çiftlerinin dizilimine göre Faz I bakterilerde ortaya konmuştur. Ayrıca dizilimlerin dağılımlarının Q ateşi hastalığının akut ve kronik formlarından izole edilen suşlarla korelasyon gösterdiği de saptanmıştır. *C. burnetii* Nine Mile ve Priscilla suşları kimyasal olarak karşılaştırıldıklarında akut ve kronik hastalıklara neden olan etkenlerde yan zincir şeker

kompozisyonunda belirgin farklılıkların olduğunu ve *C. burnetii* O serotiplerinde varyasyonlar meydana gelebildiği bildirilmiştir. Ara faz etkenlerde bulunan lipopolisakkaritler ise Faz I etkenlerin yapısında olan lipopolisakkaritler ile benzerlik göstermektedir fakat bu fazda β -D-virenoz bulunmamaktadır. Faz II etkenlerde O-polisakkarit yan zincir şekeri ise tamamıyla bulunmamaktadır. Faz II lipopolisakkaritleri ise enterobakteriyel iç çekirdek bölgesi ile karşılaştırıldığında D-mannoz (D-man), D-gliserol-D-mannoheptoz (D,D-Hep) ve 3 deoksi- α -D-manno-oct-2-ulopiranozid (Kdo) komponentlerinden oluşmaktadır. Genellikle dış çekirdek, yaygın piranozidik heksozların dallı oligosakkaritlerinden meydana gelmiştir. *C. burnetii* Faz II etkeninde terminal D-Man molekülü bulunmaktadır ve bu molekül, dış çekirdek bölgesinin sentezlenmesi sırasında mutasyonel olaylarda rol oynamaktadır. *C. burnetii* lipid A molekülü ise tipik β -(1,6)-bağlı D-glukozamin (GlcN) disakkarit çatısından oluşmaktadır. Hekzaaçil enterobakteriyel lipid A molekülünden farklı olarak *C. burnetii*'nin içerdiği Lipid A molekülü tetraaçil yapısındadır (Honstetter ve ark 2004).

İmmün hücrelerin lipopolisakkaritler ile aktivasyonu olayı primer Lipid A molekülü ile gerçekleştirilmektedir ve bu olaydaki varyasyonlar biyolojik aktivitenin dramatik bir halde düşmesine yol açmaktadır. Tipik enterobakteriyel lipopolisakkaritlere karşı monositlerden salınan sitokin miktarı ise *C. burnetii* etkeni için salınan sitokin miktarından daha yüksek olarak saptanmıştır. In vivo ortamda Toll-like-reseptörlerin (TLR) bakteriyel fagositozda önemli rol oynadığı bilinmektedir, fakat bu reseptörlerin, *C. burnetii* enfeksiyonunun organizma içinde kontrol altına alınmasında etkisiz kaldığı bildirilmiştir. TLR2 reseptörlerinden yoksun makrofajların *C. burnetii* Faz II enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlı olduğu ve yangısal sitokinlerin bu infeksiif dönemde salgılanmadığı belirlenmiştir. Ayrıca *C. burnetii* lipid A molekülünün antagonistik etkisi ve enterobakteriyel lipopolisakkaritlerin TLR4 aktivasyonunun biyosentetik prekürsör olan Lipid IV molekülü ile sağlandığı da saptanmıştır. Dendritik hücrelerin aktivasyonu ve maturasyonunun sadece Faz I etkenlerinde görüldüğü bildirilmiştir. Faz I etkenlerdeki lipopolisakkaritlerin yapısının komple olduğu ve bu yapısal özelliğin bakteriyi TLR2 reseptörlerinden koruduğu saptanmıştır. Patojenlerle ilişkili çeşitli kalıp moleküllerin doğal bağışıklık sistemi tarafından tanındığı bilindiğine göre bakteriyel etkenin fagositozdan kurtulmasının, TLR interaksiyonlarındaki varyasyonlara dayandığı sonucuna ulaşılmıştır (Golenbock ve ark 1991).

1.5.6. Genetik Organizasyon ve Lipopolisakkarit Biyosentezi

LPS yapısında bulunan O polisakkaritlerin ve oligosakkaritlerin biyosentezi için meydana getirilen genetik kod, süregelen genlerin kümelenmesi ile oluşmaktadır. Bu genler farklı bölgelerde bulunmalarına karşın bakteriyel kromozomlara yakın olarak yerleşmektedir. Lipid A biyosentezini yönlendiren genler yüksek derecede korunmaktadır ve genom etrafında lokalize olmuş şekildedir. *C. burnetii* etkeninde O antijen geni ve çekirdek oligosakkarit gen kümeleri için iki farklı bölge bulunmaktadır. O polisakkarit gen kümeleri, 30 kilobazlık bir alanda yerleşmektedir ve nükleotid difosfat (NDP) –aktif şeker prekürsörleri glikozil transferaz enzimleri gibi genlerin sentezinden sorumlu olmaktadır. Genlerin kümelenme organizasyonu kısıtlıdır ve muhtemel transkripsiyonel üniteler o-polisakkarit genleri ile ilgili olmayan genler tarafından durdurulmaktadır. O polisakkarit gen kümelerinin kromozomal lokalizasyonu da yüksek derecede korunmaktadır ve enterobakterilerde ise his geni lokusunu içermektedir. *C. burnetii* etkeninde his lokusu varlığı belirlenememiştir, fakat hisB benzeri bir genin varlığı, gen kümesinin 5' ucunda belirlenmiştir. Bu nadir organizasyon, gen kazanımı ya da gen düzenlenmesi olayları belirtmektedir ve potansiyel olarak gen kümesi boyunca sıralanmış olan iki adet transpozaz enzimi ile ilişkilidir (Shannon ve ark 2005).

O antijeni ünit yapısıyla ilgili olarak GalU- α -(1,6)-GlcN disakkaritinin formasyonu için aktif edilen şeker prekürsörü metabolit havuzundan karşılanmaktadır. *C. burnetii* spesifik β -D-virenoz şekeri ve L- dihidroksistreptoz moleküllerinin sentezlenme yolları henüz açıklanamamıştır, ancak doğada benzer şeker rezidüleri bulunmaktadır. *Yersinia enterocolitica* O:8 serotipinin O antijeni 6-deoksi-guloz rezidüsüne sahiptir. *Yersinia* için tasarlanan biyosentez aşamalarında 6-deoksi-guloz molekülü, bazı bölümlerde NDP-heksoz prekürsörleri tarafından sentezlenebilmektedir. L-hidroksistreptoz ise streptomisin şeker parçası olarak bilinmektedir ve *Streptomyces griseus* bakterisinin sekonder metabolizma ürünü olarak sentezlenmektedir. Biyosentez aşamaları iyi derecede karakterize edilmiştir analog fonksiyona sahip enzimler *C. burnetii* etkeninde de bulunabilmektedir (Pissowotzki ve ark 1991).

C. burnetii etkeninde O polisakkariti sentezlenmesi, ATP taşıyıcı moleküller sayesinde olmaktadır. O polisakkarit zinciri, tamamıyla sitoplazmik membranın iç tarafından sentezlenmektedir. Sentezlenen bölümde yüksek derecede spesifik ve aktif olan

glikoziltransferaz enzimleri lokalize olmaktadır. O polisakkarit gen kümeleri için iki adet glikoziltransferaz enzimi görevlidir ve ilave transferaz enzimleri de gerekebilmektedir. O polisakkarit zincirlerinin terminal modifikasyonu, ATP taşıyıcı moleküllerin zincir terminasyonu olayı ile ilişkilendirilmiştir. β -D-virenoz ve L-dihidroksistreptoz molekülleri *C. burnetii* için bildirilmiştir ve şeker rezidülerinin transferi de zincir terminasyonu ve O polisakkaritlerinin ihracı ile başlamaktadır (Raetz ve ark 2002).

Çekirdek oligosakkarit gen kümeleri için belirlenen bölgeler ise yaklaşık 27 kilobazlık bir alanda mevcut bulunmaktadır ve şeker prekürsör sentezi ve heksoz rezidülerinin transferinden sorumlu genler, bu bölgelerde bulunmaktadır (Zhang ve ark 1997).

C. burnetii Nine Mile suşunun faz değişim aşamasında O antijenlerinden sorumlu polisakkaritleri oluşturan genlerin sekansiyel kayıpları görülmektedir. Faz I ve Faz II izolatlarında RFLP (restriction fragment length polymorphism) kalıp karşılaştırması sonucu O antijeni genlerinin kaybı ve kromozomal delesyon olaylarının iki faz arasında benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Fakat bazı izolatların sekans analizleri sonucu kromozomal delesyon ve lipopolisakkarit kemotipi arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. *C. burnetii* RSA514 ve Avustralya'da izole edilen bir suş olarak AUST II etkenlerinde ara fazda O-spesifik zincirde β -D-virenoz bulunmamaktadır. AUST II suşunda ayrıca O antijen kümelerinde 32 kilobazlık bir alan kaybolmuş vaziyettedir. *C. burnetii* RSA514 ve Avrupa aşı suşu M44 serotiplerinde tam LPS bulunmaktadır. RSA34 suşunda ise 26 kilobazlık bir alan silinmiş olarak bulunmaktadır. Gram negatif etkenlerdeki faz varyasyonları, replikasyon hataları, erken terminasyon sonucu gelişen kalıp mutasyonları sebebiyle genellikle spontan bir süreç izlemektedir. Alternatif olarak PmrA/PmrB ve PhoP/PhoQ gibi bakteriyel duyu sistemleri, çevre koşullarına tepki ve konak hücrede yaşama adaptasyon gibi durumlarla ilişkili olarak LPS moleküllerinin indirgenmesine yol açmaktadır. *C. burnetii* etkenindeki kromozomal delesyonlar, faz değişimi için olan tek mekanizma değildir. LPS biyosentez aşamalarının daha detaylı analiz edilmesiyle birlikte diğer mekanizmaların saptanabileceği düşünülmektedir (Gunn ve ark 1998).

1.6. Genomik Özellikler

C. burnetii etkeni, 2 Mbp'lik küçük sirküler bir kromozom yumağı içermektedir. Çoğu izolat, 32 kilobaz ile 51 kilobazlık plazmidleri içermektedir ve bu plazmidler, toplam genom formasyonunun % 2'lik bir kısmını oluşturmaktadır. Kalıcı plazmid taşımayan suşlarda 16 kilobazlık plazmid benzeri sekanslar kromozomlara entegre halde bulunmaktadır. Genomda G+C konsantrasyonu toplam moleküler ağırlığın % 43'ünü oluşturmaktadır. İntrasellüler bakterilerde genom redüksiyonu olayı, spesifik konak hücrelerinde yaşama adaptasyon sağlamak açısından önemli bir olaydır. Bu süreç sırasında ilgisiz genler elimine edilmektedir. *C. burnetii* için 83 psödogen identifiye edilmiştir. Bu genlerin çoğu tek kalıp halindedir ve nokta mutasyonlarını içermektedir. Psödogenler, *C. burnetii* genomunda gen redüksiyonunun başlamasının erken olduğunu gösterir ve bir önceki orjin suşun konak hücreye adaptasyon sağladığının belirleyici faktörüdür. Diğer intrasellüler bakterilere nazaran, mobil genetik elementlerin çeşitliliği, *C. burnetii* genomunda sabit olarak bulunmaktadır. 3 adet dejenere transpozon ve 29 adet IS element belirlenmiştir. IS111 elementi yaklaşık 1400 bp'lik inzersiyon sekansı içerir ve bu sekanslar 7 bp'lik kalıplar halinde kendini tekrar etmektedir (Guo ve ark 1997).

Kromozomal bir köken saptanması için kullanılan plazmid kurtarma tekniği sonucu 5.8 kilobazlık EcoRI kalıbı üzerinde bulunan otonom replikasyon sekansı saptanmıştır. Plazmid replikasyonu için gereken minimum alan ise 403 bp kalıp aralığına kadar indirilebilmiştir. Bu minimum otonom replikasyon sekansı, önemli bir homolog yapı göstermemektedir, fakat kromozom benzeri bir orjine dayandırılmaktadır. Bu yapıya denk gelen kalıplardan 60 kDa büyüklüğünde iç membran proteini rnpA ve rpmH genleri tarafından kodlanmaktadır. Normal olarak bu genler diğer bakterilerde oriC geninin yakınlarında bulunmaktadır. Bu yapısal benzerliklere ve *E. coli* etkeninde olan plazmid replikasyonu desteklenmesi durumuna rağmen ars geninin kromozomal replikasyonu başlatıcı özelliği için herhangi bir deneysel çalışma yapılmamıştır. Ayrıca oriC geninin *C. burnetii* etkenindeki fonksiyonu belirsizliğini korumaktadır. Ars geninin izolasyonu ve identifikasyonu ile birlikte *C. burnetii* etkeninin manipülasyonu için gereken stabil genetik sistemlerin geliştirilmesi de mümkün olabilecektir. İlk yapılan çalışmalarda ColE1 tipi vektör geni oluşturulması için gereken ars geni, *C. burnetii*-spesifik replikon olarak kullanılmıştır. Transformant genomların genetik analizleri sonucu vektörün otonom replike sistemleri açığa çıkarılmıştır. ARS gen yumaklarının transformant genomlarda duplikasyonu ve entegre vektör ile köprü kurması, replikasyon olayının devamlılığı ve dayanıklılığı açısından *C. burnetii* için potansiyel bir genetik manipülasyon olduğunu

ortaya koymuştur. Seleksiyon olayı ise spontan dirençli bakterilerde engellenmiş bir süreçtir ve uzun süreli ampisilin tedavisinde plazmid DNA'sı ortadan kaybolmaktadır. Bu zorluklara karşılık replikon olarak yeşil floresan proteini kodlayan 5,8 kilobazlık ars kalıbı meydana getirilmiştir. Bu yeni metotla hücre kültüründe elde edilen transformant genomların saptanabilir hale gelmesi ve patojen-konakçı arasındaki interaksiyonların belirlenebili olması sağlanmıştır (Lukacova ve ark 1999).

1.7. DNA Tamir Mekanizmaları

C. burnetii etkeni, fagolizozomlardaki asidik ortam şartı sonucu DNA'ya hasar veren etkenlere maruz kalmaktadır ve genomik stabilite ve entegre olabilme yeteneği, genetik dağılım açısından ortam şartlarına göre kritik bir faktör haline gelmiştir. DNA tamir mekanizmaları, direkt tamir, eksizyon tamiri ve rekombinasyonel tamir olmak üzere üç önemli kategori altında incelenmektedir. Direkt tamir en basit formdur ve normal DNA yapısı gen çatısı bozulmadan enzimatik olarak eski haline getirilir. Bu mekanizmada fotoreaktivasyon sistemi (phrAB) ve metiltransferaz ile metil gruplarının uzaklaştırılması bulunmaktadır. *C. burnetii* ise fotoliaz sistemine ait phrB genini içermektedir (Morimatsu ve ark 2003).

Eksizyon tamiri ise aktif yer değiştirmeyi içerir ve hasarlı baz yada komşu nükleotidlerin zarara uğratılması esasına dayanır. Eksizyon tamirinde nükleotid eksizyonu, baz eksizyonu ve uyumsuz tamir olayları meydana gelir. Nükleotid eksizyon olayı *C. burnetii* için ortaya konmuştur. DNA glikozilaz ve endonüklez enzimleri de baz eksizyon olayı ile ilişkili olmaktadır. Uyumsuz tamir sistem ise DNA replikasyonu sonrası uygunsuz olarak dizilen baz çiftlerini tanımaktadır. Uyumsuz tamir sistemi, *C. burnetii* etkeninde tam olarak bulunmamaktadır. Sadece mutL ve mutS genleri vardır ve diğer bakterilerde saptandı gibi mutH geninin yokluğu, uyumsuz gen tamiri olayı için yetersizlik meydana getirmektedir. Konak hücrenin önemli bir savunma mekanizması olan oksidatif DNA hasarı, mutasyonel uyumsuzluğun giderilmesini de büyük ölçüde engellemektedir. Rekombinasyonel DNA tamir sistemi için iki ana mekanizma bilinmektedir. RecA geni, bu mekanizma içinde major regülatör gen pozisyonundadır ve DNA hasarı sonucu hemen devreye girmektedir (Morimatsu ve ark 2003).

Derrick tarafından Q Fever hastalığının 1937 yılında tanımlanmasından bu yana *C. burnetii* etkeninin doğal yapısının anlaşılması için önemli çalışmalar yapılmıştır. Legionellales takımının yeniden sınıflandırılması, γ Proteobacteria familyası içinde fenotipik ve genotipik benzerliklerin *C. burnetii* ve *Legionella pneumophila* arasında ortaya konması bu çalışmalara örnek olarak gösterilebilir. Her iki patojen de membrana bağlı vakuol içinde bulunmaktadır ve yüksek derecede dirençli ekstrasellüler hücre formasyonuna dönüşebilmektedir. Çoğu intrasellüler bakterinin kendi hücre içi homeostazisi sağlayabilmektedir. Buna kanıt olarak, *Legionella pneumophila* etkeninde bulunan tip IV sekresyon sisteminde efektör moleküller önemli rol oynamaktadır. *C. burnetii* etkeninde de fagozom maturasyonunun engellenmesi, geniş vakuollerin formasyonu ve oksidatif aktivitenin önlenmesi için efektör moleküller devreye girebilmektedir (Vogel ve ark 2004).

Fagozomal vakuoller, sekonder fagolizozomlara benzemektedir. Doğal bağışıklık sisteminin komponenti olan fagositik hücrelerin bölümü olarak bazı enzimleri, defensin, oksijen ve nitrojen radikallerini içermektedir. Bu yapılar invaziv bakterilerin inaktivasyonu ve degradasyonuna yol açmaktadır. Bu yıkıcı ortam şartlarında *C. burnetii* etkenini üremesi için yüksek adaptif fizyolojik hücre yapısı ve koruyucu mekanizmalar gerekmektedir. Genom sekanslanması ve biyokimyasal özelliklerin karakterizasyonu sonucu *C. burnetii* etkeninde geniş spektrumlu metabolik kapasite ve taşıma sistemleri saptanmıştır. Konak hücre dışında minimal aktivitenin devam ettirilebilmesi için ATP havuzunun yaratılması hilesi, *C. burnetii* etkeninin konak hücreye ve enfeksiyon siklusuna yüksek derecede adaptasyon sağlamasına yaramaktadır. Buna ek olarak bazı enzimlerin ekspresyonu, alkilhidroksiperoksidazlar ve DNA tamir sistemindeki çeşitlilikler de konakçı kaynaklı oksijenin ve nitrojenin aktive olmamış fagositik hücrelerde miktarının düşürülmesini sağlamaktadır (Clifton ve ark 1998).

C. burnetii etkeninde faz varyasyonu lipopolisakkaritlerin kemotipi ve virulans kaybı ile şekillenmektedir. Faz değişiminin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır ve kromozomal delesyon olayı ile korelasyon göstermektedir. Tam LPS'ler Faz I bakterileri TLR bağımlı tanınma mekanizmasına karşı koruyabilmektedir (Weinberg ve ark 2000).

1.8. Patogenezis

Coxiella burnetii sıklıkla kontamine toz ve damlacıkların solunmasıyla, daha az oranda enfekte süt ve süt ürünlerinin alınması ve derideki sıyrıklardan içeriye girmesi ile insana bulaşır. Etken önce akciğerlere yerleşmekte oradan hematogen yolla diğer organlara yayılmaktadır. İnkubasyon periyodu alınan inokulum dozuna bağlı olarak 14-39 gün arasında değişmektedir. Q hurnması enfeksiyonu asemptomatik, akut ve kronik olmak üzere üç farklı klinik seyir göstermektedir. Enfeksiyonun, olguların çoğunda hafif hatta belirtisiz seyrettiği bildirilmiştir (Mandell ve ark 2000).

Coxiella burnetii enfeksiyonları genellikle sıvısal ve hücrel immun yanıt ile kontrol edilmektedir. Akut enfeksiyondan hemen sonra faz II'ye karşı IgM antikorları daha sonra da IgA ve IgG tipi antikorlar oluşmaktadır. *C. burnetii* enfeksiyonu T hücre cevabı ile kontrol edilmektedir. Ancak hücrel immunité enfekte konaktan *C. burnetii*'nin eradikasyonunu sağlayamadığı için kazanılmış immunsupresyonu olan hastalarda tekrarlayan enfeksiyonlara yol açabilir.

Q ateşinde esas belirti akciğerlerdedir. Tipik histopatolojik lezyon konsolidasyon, interstisyel infiltrasyon ve alveoler eksudasyondur. Alveoler eksudat içinde mononükleer hücreler, fibrin ve eritrositler bulunur. Akciğerde damar tutulumuna bağlı olarak kanama ve nekroz alanlar saptanır, Akciğerdeki patolojik bulgular Q ateşi için spesifik değildir, atipik pnömoni yapan diğer etiyolojik ajanların bulguları ile (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *C. psittaci*) karışabilir (Westlake ve ark 1987).

Karaciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde fokal hepatoselüler nekroz, makrofaj, lenfosit ve polimorf lökositlerden oluşan infiltratif hücreler, ayrıca tipik "halka şeklinde" granülomlar (Doughnut granülomu) görülür. Bu granülomların merkezinde yoğun bir fibrin halkası, multinükleer dev hücreler ve çevresini saran bir yağ vakuolü vardır. Bu granülomlar Q ateşi için oldukça tipik olmakla birlikte Hodgkin hastalığında, tifoda ve enfeksiyöz mononükleozda da görülebilir. Kemik iliği lezyonları genellikle karaciğerde bulunan lezyonlara benzerdir. Burada da Doughnut granülomları ile birlikte makrofaj, lenfosit, polimorf lökositler ve multinükleer dev hücreler bulunur. Enfekte kalp kapaklarındaki tipik vejetasyonlar oldukça küçüktür ve ekokardiyografi ile saptanması zordur. Histolojik bulgular nonspesifiktir, fibrin, trombus, nekroz, nekrotik hücre yıkımları, kalsifikasyon ve fibroblastlar genelde bulunmaktadır. *C. burnetii*

immunohistokimyasal yöntemlerle infekte kapak örneklerinden sıklıkla izole edilebilmektedir. Vejetasyonlardan kaynaklanan arteriyel emboliler başlıca dalak, böbrek ve beyin olmak üzere bir çok organda infarktüse neden olabilirler. Ayrıca Q ateşi endokarditi esnasında başta glomerulonefrit olmak üzere immun komplekslere bağlı komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Silver ve ark 1984).

1.9. Q Ateşi Hastalığında İmmun Yanıt

Q Fever hastalığı, *C. burnetii* tarafından meydana getirilmektedir. Bu obligat intrasellüler bakteri *Legionella* türleri ve *Francisella tularensis* ile filogenetik olarak benzerlik göstermektedir. İnfekte bireyler genellikle etkeni aerosol yolla almaktadırlar. Bunun sonucunda primer infeksiyon oluşmaktadır. Primer infeksiyonların çok azı kesin teşhisle sonuçlandırılmıştır. Çünkü klinik olarak hasta bireylerin yarısından fazlasında semptomlar belirgin değildir ve elde edilen serokonversiyon ile teşhis desteklenememektedir. Çoğu zaman akut Q ateşi hastalığı kendiliğinden sonlanabilmektedir. Fakat bazı durumlarda hastalık persiste edebilir ve antibiyotik tedavisi gören bireylerde tekrar ortaya çıkabilmektedir. İnfekte bireylerde hastalık, aylar hatta yıllar sonra kronik formda ortaya çıkabilmektedir. Q ateşi hastalığının ana semptomu endokarditis olarak saptanmıştır. Kan kültürü negatif olan bireylerin % 48'inin *C. burnetii* ile infekte olduğu bildirilmiştir. Q ateşi hastalığına bağlı endokarditis vakarlarında fibrozis ve kalsifikasyon görülmektedir. Doksisisiklin ve klorokuin kombinasyonlu terapilerde hastalığın prognozu değişmektedir ve bu tedavinin uygulandığı bireylerin sadece % 5'inde 18 ay sonra tekrarlayan Q ateşi hastalığı görülmüştür. Doksisisiklin kan konsantrasyonu ve antikor seviyelerinin düşmesinin de korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca *C. burnetii* için iki yeni evrimsel form bildirilmiştir (Izzo ve ark 1988).

1.9.1. Primer Q Ateşi Hastalığında Protektif İmmun Yanıt

Primer hastalıkta infeksiyonun kontrolü sırasında sistematik hücre kaynaklı immün yanıt ve granulom formasyonu görülmektedir. Granulomatöz lezyonlarda makrofajlar ve epitelyal hücreler, ayrıca multinükleer dev hücreleri de bulunmaktadır. Akut hastalıkta hepatitis görülen bireylerde proliferatif yanıtlar gözlenmiştir. Formalin ile inaktive edilen etken ile aşılanmış hastalarda spesifik lenfoproliferasyon ve interferon miktarlarında artış gözlenmiştir. Granulom formasyonu ve interferon üretimi, immün yanıtın Th1 tip

polarizasyon gsterdiğini ortaya koymuştur. Q ateşi hatalığının immun kontrolü ise etkenin eradikasyonunu sağlamamaktadır ve hayvanlarda *C. burnetii* yayılımı devam etmektedir. Akut infeksiyondan yıllar sonra bile kan dolaşımında ve kemik iliğinde etken DNA'sı bulunabilmektedir (Izzo ve ark 1988).

İnfeksiyonun yayılma yolu, organizmaya giriş miktarı gibi etkenler, hastalığın seyrini etkilemektedir. Ayrıca hastalığın meydana gelmesinde solunum yolu ile pnömoni, hepatitis ile intraperitoneal yol birbiriyle ilişkili olmaktadır. Hastalık erkek bireylerde, dişi bireylere nazaran daha fazla görülmektedir. Östradiol 17- β 'nin etkisi, cinsiyet farklılığı açısından önemli olarak saptanmıştır. CB6BL/6 farelerde, erkek bireylerde granuloamların daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca farelerde yaş faktörü de hastalık oluşumu açısından araştırılmıştır. Bakteriyel doku hasarı ve granuloam sayısının 14 aylık farelerde, 1 aylık farelere nazaran daha fazla olduğu görülmüştür (Leone ve ark 2004).

1.9.2. Kronik Q Ateşi Hastalığında Defektif İmmun Yanıt

C. burnetii infeksiyonu, immunkompromize hastalarda kronik hale gelebilmektedir. Hücresel immunité bozukluğu olan farelerde hastalığın kronik hale geldiği bildirilmiştir. Kortikosteroid tedavisi ve bütün vücudun irradasyone edilmesi, deneysel infeksiyonlarda hastalığın kronik hale gelmesine yol açmaktadır. Fareler siklofosamid aldıkları zaman infeksiyonun tekrar ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Sabatier ve ark 1997).

Kronik Q ateşi hastalığının defektif hücresel immunité ile karakterize edilmesi ile hücresel immunitenin korunmada önemli rol oynadığı ortaya çıkmaktadır. Gelişmemiş hücresel immunité, karaciğerde granuloamlar yerine lenfosit infiltrasyonu ve nekrozis ile ölçülebilmektedir. Q ateşi endokarditis hastalarında lenfosit proliferasyonu görülmemektedir. Bunun nedeninin olgunlaşmamış T hücrelerinin alterasyonu olduğu, fakat CD4⁺ lenfopenisi saptanan tedavi edilmiş bireylerde immun yanıtın normal seviyelere çıktığı belirlenmiştir. Spesifik supresyon olayı ise prostaglandin E2 yada sitokinler gibi immunregülatör mediyatörler tarafından sağlanmaktadır. İnterlökin 10 (IL-10)'un, özellikle kronik Q ateşi hastalığında aşırı derecede üretilmesinden dolayı immunsupresyona ve regülatör T hücrelerinin indüksiyonuna yol açmaktadır. Sitokin ve kemokinlerin defektif olarak etkilemesinin immunokompetent hücrelerin hedefe yönelik yetersiz migrasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca *C. burnetii* ile infekte monositlerin tümör

nekrozis faktörü (TNF) ile birlikte endotelyumlarda defektif transmigrasyona uğradığı da bildirilmiştir (Dellacasagrande ve ark 2000).

Kronik Q ateşi hastalığında immunsupresyon olayı ekzakarbasyona uğramış yangısal yanıt ile ilişkilidir. Endokarditis ile seyreden vakalarda şiddetli yangı oluşumu belirlenmiştir (Sabatier ve ark 1997). TNF ve IL-6 seviyeleri de dolaşımda yükselmektedir. Lökosit aktivasyon molekülü olan CD23'ler, IgE'lere düşük affinite göstermelerine karşın hastalığın kronik döneminde hızla artmaktadır. Buna ek olarak TNF ve IL-1 düzeyleri, endokarditis semptomu gösteren hastalarda akut dönemde belirgin düzeyde artmaktadır. TNF üretimi, hastalığın aktivitesi ile doğru orantılı olmaktadır. İlk zamanlarda, hastalığın teşhisinin yeni konulduğu bireylerde TNF üretimi yüksektir. Tedavi sürecinin başlaması ile birlikte düzey düşmektedir. Daha sonra, TNF üretimindeki en yüksek artış, IgG seviyesinin yükseldiği zamanda görülmektedir. Kemokinlerin ve monosit kemoatraktant proteinlerin (MCP-1) üretimi de akut endokarditis ile seyreden Q ateşi hastalığında monositlerden yüksek oranda elde edilmektedir. IL-6 üretimi ise hem akut, hem de kronik Q ateşi hastalığında yüksek seviyede görülmektedir. Sonuçta immunsupresyon ve ekzakarbe inflamasyon olayları kronik Q ateşi hastalığı ile ilişkilidir (Capo ve ark 1999).

1.9.3. Q Ateşi Hastalığında Doğal Bağışıklık

C. burnetii etkeni, miyeloid kökenli hücrelerde obligat intrasellüler olarak yaşamını sürdürmek zorunda olan bir etkindir. Bu nedenden dolayı, makrofajların mikrobisidal ve fagositik aktivitesinin bozulması, etkenin rahatlıkla üreyebilmesi için gerekli olan başlıca faktörlerdendir (Pentilla ve ark 1998).

1.9.4. *C. burnetii* Fagositozu

C. burnetii etkeni, fagositozdan kurtulmak için daha önce diğer intrasellüler bakterilerde bildirilmemiş bir strateji geliştirmiştir. Monositlerde, *C. burnetii* etkeni zayıf olarak internal bölgede bulunmaktadır, buna rağmen başarılı bir şekilde yaşamını sürdürebilmektedir. Fakat avirulent tip etkenler yeterli derecede ve hızlı bir şekilde elimine edilmektedir. Virulent *C. burnetii* etkenlerinin fagositozu $\alpha\beta3$ integrinlerin vasıtasıyla

gerçekleşmektedir. Virulent etkenlerin düşük derecede olan fagositoz olayı ise *C. burnetii*'nin integrinler ile kros reaksiyona girmesinden dolayı şekillenmektedir. Ayrıca monositlerin daha önceden virulent etkenlerle karşılaşması sonucu integrin kaynaklı aktivasyonu önlemektedir. $\alpha\beta3$ 'ün diğer integrinlerden ayrılması sonucu makrofajlar uygunsuz biçimde aktive olur, protein tirozin kinaz (PTK) sentez mekanizması devreye girmektedir. Virulent *C. burnetii* etkenleri filamentöz aktinlerin (F-aktin) psödopodal ekstensiyonunu uyarmaktadır, ancak avirulent etkenlerin bu konuda herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (Meconi ve ark 1998). F-aktin organizasyonu da PTK aktivasyonuna bağlıdır. *C. burnetii* etkeni erken PTK aktivitesini indükler, böylece endojen substratlarda tirozin fosforilasyonu olayı başlamış olmaktadır. Tirozin kinaz aktivitesi stimüle hücre fraksiyonlarında gözlenmektedir ve tirozin fosfoproteinleri protruzyonlar içinde F-aktin molekülleri ile birlikte lokalize halde bulunmaktadır. Daha sonra psödopodal ekstensiyon ise *C. burnetii* intenaslizasyonunda daha kompleks bir role sahiptir. Diğer yandan bu olay, enteropatojenik *E. coli* tarafından stimüle edilen makrofajlarda belirtilen pedestal formasyondaki fagositoz bozukluğu ile de ilişkilidir. Fakat bu makrofajlar, F-aktin protruzyonları ile beraber lokalize oldukları için, virulent *C. burnetii* etkeninin internalizasyonu için gerekli komponentlerdir. İntegrin molekülleri de monositlerde *C. burnetii* tarafından indüklenen psodopodal ekstensiyonların dışında kalmaktadır. Monosit stimülasyonundan sonra psodopodal ekstensiyonlara integrinlerin girişi şekillendiği takdirde *C. burnetii* fagositozu olayı da artış göstermektedir. Bundan dolayı fagositoz reseptörlerinin lokalizasyonu, *C. burnetii* etkeninin hücre içine alınma olayını ve etkenin yaşamını kontrol eden bir durum olmaktadır (Goosney ve ark 2000).

1.9.5. *C. burnetii*'nin İntrasellüler Dolaşımı

İnternalize *C. burnetii* etkeninin asidik ortama karşı adaptasyonu, diğer bakterilere nazaran yaşamını etkileyen önemli faktörlerdendir. Bu olay ayrıca fagozom maturasyonunu da bozmaktadır. İntrasellüler yaşama *C. burnetii*'nin adaptasyonu fagozomlarda bulunan asidik pH ile ilişkilidir. Asidik pH, *C. burnetii* için gerekli olan besin maddelerinin hücre içine alınmasını sağlamaktadır, ayrıca bakteriyi antibiyotiklerden korur. Bundan dolayı fagozomal kompartmanı alkali ortama çeviren klorokuin gibi lizozomotropik ajanlar, makrofajların mikrobisidal aktivitesini artırmak için doksisisiklin gibi ilaçlarla kombine edilmektedir. *C. burnetii* etkenleri asidik ortamda yaşamlarını

sürdürürken, bu kompartmanın fagolizozom olduğu düşünülmektedir. Farelerdeki makrofaj hücrelerinde ve nonfagositik hücrelerde *C. burnetii* etkenleri lizozomlarla füzyona uğrayan geniş vakuollerde üremektedir. Bu vakuoller de maya gibi etkenleri ya da *Mycobacterium* etkenlerini içeren diğer vakuoller ile birleşebilmektedir. Verohücreleri gibi nonfagositik hücrelerde *C. burnetii*'yi içeren vakuoller de proton ATPaz, lizozom ilişkili membran proteinleri, katepsin D ve asit fosfataz gibi olgun fagolizozomlar gibi hareket edebilmektedir. Bu moleküllerin bakteriyel vakuollerle olan interaksiyonları, peptid yüklenmesinin azaltılması ile antijenik peptid formasyonunun geciktirilmesi olayına dayanmaktadır (Lem ve ark 1999). Yapılan çalışmalarda avirulent suşlar kullanıldığı için virulent *C. burnetii* etkenlerinin makrofajlardaki yaşam siklusu yeterince aydınlatılamamıştır. Örneğin virulent *C. burnetii*'nin replikasyonu makrofajlarda sınırlıyken, avirulent suşlarda yüksek sayıda bakteriyel hücre proliferasyonu görülmektedir. Ayrıca virulent suşlar memeli makrofajlarında yaşamlarını sürdürebilirken, avirulent suşlar ise elimine edilmektedir. Hem virulent, hem de avirulent olan organizmalar asidik fagozomlarda hayatlarını sürdürebilmektedirler. Bundan dolayı makrofajlarda *C. burnetii*'nin yaşamına devam etmesi vakuoler pH'ya bağlı bir durum olmamaktadır. Virulent *C. burnetii* etkenini içeren fagozomlarda olgunlaşma tam olarak gerçekleşmemektedir. Elimine edilen avirulent varyantlar, olgun fagozomlarda bulunmakta ve katepsin D ile birlikte nonfagositik hücrelerde olduğu gibi lokalize şekilde seyretmektedirler. Bu bulgular ışığında *C. burnetii* etkeninin makrofajlarda fagositoz ile kontrolü sağlanmaktadır ve fagolizozomal füzyon oluşumu engellenmektedir. Enfekte bireylerden elde edilen monositlerde yetersiz olgunlaşma ve mikrobisidal aktivitede düşüş tespit edilmiştir. Defektif fagozom maturasyonu, ekzojen IL-10 ile birlikte monositlerde gerçekleşmektedir. Bundan dolayı etken eliminasyonu ve fagozom maturasyonu, Q ateşi hastalığıyla ilişkili olmaktadır ve sitokinler tarafından kontrol edilmektedir (Feldmann ve ark 2005).

C. burnetii genom analizleri sonucu, fagozom maturasyonunu makrofajlarda kontrol edebilecek bazı komponentler ortaya çıkmıştır. Ayrıca aynı genetik formasyona sahip olan *L. pneumophila* ve *C. burnetii* etkenlerinde tip IV sekresyon sistemi identifiye edilmiştir. *L. pneumophila*, *F. tularensis* ve *C. burnetii* etkenlerinde fagozomal taşıyıcı sistemler de ortaya konmuştur. Bu taşıyıcılar, fagozomal besin maddesi depolama işleminde rol almaktadır (Sauer ve ark 2005).

1.9.6. Toll-like Reseptörler ve *C. burnetii* Sensörleri

Toll-like reseptörler (TLR), infeksiyöz patojenlere karşı hem doğal dirençte, hem de kazanılmış bağışıklıkta kritik bir öneme sahiptir. TLR'ler, mikrobiyel etkenlerde korunan moleküler yapıları tanıyıp patojen kontrolünü sağlamakla görevlidirler. *C. burnetii* ise TLR2 ve TLR4 ile tanınabilmektedir. *C. burnetii* etkeninde LPS olması, sensörler ile birlikte bakteriyel tanınmayı kolaylaştırmaktadır. *C. burnetii*'nin fagositozu da TLR4 ve LPS'ler ile ilişkilidir. TLR4'lerin LPS'ler ile olan bağlanması sonucu $\alpha\beta3$ integrinler indüklenmektedir. *C. burnetii*'nin makrofajlarla olan interaksyonu sonucu aktin hücrelerinin yeniden organizasyonu da TLR4 hücrelerine bağlıdır. Ayrıca, filopodların formasyonu ve sıkıştırılması TLR4 yokluğunda mümkün olmamaktadır. *C. burnetii* bir kez hücre içine alındığında, ortamdaki TLR4 varlığına bağlı olarak fagozom maturasyonu ve mikrobisidal aktivitede artış gözlemlenmektedir (Takeda ve ark 2003).

TLR4 bulunmayan farelerde yapılan bir çalışmada, granulom formasyonu araştırılmıştır. Deneysel *C. burnetii* infeksiyonu sonucu, doku infeksiyonu ve *C. burnetii* klirensinin normal farelerde ve TLR4 yetersiz farelerde aynı düzeyde olduğu saptanmıştır. Fakat granulom formasyonunun ve sitokin üretiminin TLR4 yetersiz farelerde bozuk olduğu görülmüştür. Bundan dolayı, TLR4'ün yangısal cevabı kontrol ettiği, fakat mikrobisidal kompetens açısından herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Takeda ve ark 2003).

Pepetidoglikan ve lipopeptidler tanıyan TLR2'ler ise *C. burnetii* infeksiyonu ile yakından ilişkilidir. Zamboni ve arkadaşlarının (2003) TLR2'den yoksun farelerde yaptıkları bir çalışmada TLR2'nin TNF ve interferon üretimiyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. TLR2 yetersiz farelerde avirulent *C. burnetii* etkenlerinin çoğalmasının son derece yüksek olduğu belirlenmiştir (Boehm ve ark 1997).

1.9.7. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler, hem antimikrobiyel immunitiyi başlatma, hem de self toleransın devam edebilmesi için önemli hücreler olmaktadır. Olgunlaşmamış dendritik hücreler, periferel dokularda bulunmaktadır ve yüksek kapasitede bakteriyel yük taşıma oranına sahiptirler. Bir kez aktive olduklarında, olgunlaşmak için lenf nodüllerine göç

ederler ve adaptif immunitiyi desteklerler. Monosit kökenli dendritik hücreler, intrasellüler bakterilere karşı oluşan antimikrobiyel immunitiyi indüklemektedirler. Miyeloid dendritik hücrelerin de *C. burnetii* ile infekte olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca bu hücreler, *C. burnetii*'nin replikasyonu için protektif bir niş oluşturmaktadır. *C. burnetii*, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını stimüle edememektedir. Aslında konakçı immun yanıtı tarafından elimine edilen *C. burnetii* avirulent varyantları ise dendritik hücre olgunlaşmasını ve IL-12 üretimini stimüle etmektedir (Colonna ve ark 2006).

1.9.8. Sitokin Ağı ve *C. burnetii* Ölümü ya da Replikasyonu

İnfeksiyöz hastalıkların rezolusyonu için Th1 gibi mikrobiyel sitokinlerin üretimine dayalı olan immun yanıtın stimüle edilmesi gerekmektedir. İnfeksiyöz hastalıkların kronik evolusyonu, IL-10 gibi immunregülatör sitokinlerin etkinliği ile şekillenmektedir. Spontan olarak ortadan kalkabilen akut Q ateşi haslığı ise Th1 immun yanıtı tarafından kontrol edilmektedir (Yoshiie ve ark 1999).

1.9.9. İnterferon Gamma

IFN- γ akut Q ateşi hastalığında üretilmektedir. Kronik dönemde ise interferonun üretimi defektif olarak ortaya çıkmaktadır. IFN- γ , makrofajlarda oksijen bağımlı ve oksijen bağımsız mekanizmalarda kompetensi indükleyen güçlü bir sitokindir (Dellacasagrande ve ark 1999).

C. burnetii için oluşturulan IFN- γ 'nın mikrobisidal mekanizması reaktif oksijen komponentlerine bağılı olarak gerçekleşmez. *C. burnetii*, reaktif oksijen komponentlerinden kaçmak için stratejiler geliştirmesine rağmen, bu komponentler, etken için protektif bir rol oynamamaktadır. İlk başta *C. burnetii*, monositlerden süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit salımını uyarmaz, daha sonra etken alveoler makrofajlarda nitrik oksit üretimini indükler, fakat nitrik oksit inhibitörleri, makrofajlardaki infeksiyon düzeyini belirleyemezler (Zamboni ve ark 2003).

IFN- γ *C. burnetii*'ye karşı oluşacak olan mikrobisidal programı oksijen bağımlı mekanizma ile stimüle etmektedir. IFN- γ infekte monositlere alındığında fagozomal pH'da bir değişiklik olmaz. Ancak monositler infekte olmadan hücre içine interferon alındığı zaman fagozomlar alkali olarak şekillenir. Bundan dolayı uzun süre kullanılan

antibiyotiklerin etken üzerinde herhangi bir bakterisidal aktivitesi kalmamaktadır. Vakuoler alkalinizasyonu uyaran doksisisiklin ve klorokuin *C. burnetii*'ye karşı oluşan in vitro bakterisidal aktiviteyi indüklemektedir. IFN- γ 'nın *C. burnetii*'yi ortadan kaldırma yeteneği, demir metabolizmasının regülasyonu ve polimorf lökositlerin füzyonu, doksisisiklin ve klorokuin aktivitesini tamamlamaktadır (Wahl ve ark 2001).

Obligat intrasellüler bakterilerin yaşamlarını devam ettirebilmesi için konak hücrelerin de ölmemesi gerekmektedir. Bundan dolayı hücre apoptozisi ve bakteriyel eliminasyonun şekillenmesi için ek uyarıcılara ihtiyaç olmaktadır. IFN- γ ise *C. burnetii* ile infekte makrofajların apoptozisini uyaran bir etkindir. IFN- γ 'nın bu apoptotik etkisi, TNF'lerden dolayı şekillenir. Ayrıca IFN- γ , TNF üretimini regüle etmektedir. Apoptozisi uyarması ile birlikte, TNF'ler, makrofajların mikrobisidal aktivitesini de desteklemektedirler. Bu etki, fagositoz aşamasını etkiler, fakat mikrobisidal süreci geciktirmez. Ayrıca anti-TNF antikorların nötralize edilmesi, monositler tarafından etkenin alınmasını önler, fakat uzun dönemde bakterinin yaşam siklusuna herhangi bir etkide bulunmaz. Diğer intrasellüler organizmalar için belirtildiği gibi inflamatuvar sitokinlerin aktivitesinin önlenmesi, yıkıcı etki stratejisi olarak ele alınabilir. Virulent *C. burnetii* etkenleri, monositlerden TNF salınımını avirulent suşlara göre daha az miktarda uyarırlar. Bu sınırlı etki, LPS'lerin zayıf aktivitesinin bir sonucu değildir. Normal olarak virulent suşların LPS'leri, avirulent suşların LPS'lerinden daha fazla miktarda immun sistemi uyarır. Fakat virulent suşların monositlere bağlanma aktivitesi daha zayıf olduğundan dolayı, hedef hücrelere yeterli miktarda LPS molekülü sunulamamaktadır. *C. burnetii* makrofajlarda transferin reseptör ekspresyonunu ve bunun sonucunda da hücrelerde demir birikimini sağlamaktadır. İntrasellüler demir şelatörleri ve desferoksamin gibi maddeler de *C. burnetii* replikasyonunu suprese etmektedir (Moore ve ark 2001).

1.9.10. Makrofaj Deaktivatör Sitokinler

IL-10, IL-4 ve IL-13 ile birlikte makrofajların mikrobisidal aktivitesini düzenlemektedir ve bu olay intrasellüler organizmalara karşı olan artmış duyarlılık ile ilgili olmaktadır. İlk olarak IL-10, Q ateşi hastalığına yakalanmış bireylerde mononükleer hücrelerden sentezlenmektedir. Akut hastalıklarda düşük IL-10 seviyesi ile birlikte etkenler hücre içinde elimine edilirken, kronik hastalık tablosunda ise yüksek IL-10 seviyeleri ile birlikte hücre içi etkenler çoğalabilmektedir. IL-10 nötralizasyonu ile birlikte klinik

hastalık belirtileri gösteren bireylerde monositlerin mikrobisidal aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. IL-10 sitokini, immun hücrelerin periferik dokuya göç etmesine yol açmaktadır. Mononükleer hücrelerin transendotelial migrasyonu, IL-10'un nötralize edilmesi ile ortadan kalkmaktadır (Ghigo ve ark 2001).

Q ateşi hastalığının patofizyolojisi, etkenin makrofajlarda üreyip ürememesine bağlıdır. Etkenin makrofajlarda yaşaması ise IL-10 gibi deaktivatör sitokinlerin üretilip üretilmemesi ile ilişkilidir. Gebelik gibi stres faktörleri de fetal allograftlarda IL-10 sitokinlerinin üretilmesini indükler ve böylece kronik hastalık evresine geçilmiş olur. Aslında dinlenme fazındaki monositler, *C. burnetii* etkeninin replike olmadan hayatını devam ettirebilmesini sağlar. Bakteriyel fagositoz, polimorf lökosit füzyonu ve yangısal sitokinlerin modülasyonu gibi durumlarda etken immun sistem hücrelerine yakalanmadan rahatlıkla yaşamını sürdürebilmektedir. Bu durum, etkenin persistens özelliğini açıklamaktadır, fakat hücrel immun yanıt gelişimi ile yakından ilişkili bulunmamaktadır. Spesifik hücrel yanıtın aktivasyonu sonucunda IFN- γ üretilmektedir. Böylece polimorf lökosit füzyonu gerçekleşirken *C. burnetii* etkenleri de elimine edilmektedir. TNF molekülleri de böylece ortamda birikmekte ve infekte hücreleri apoptozise götürebilmektedir. Eğer IFN- γ üretimi bozulursa, bakteriyel eliminasyon aşaması gerçekleşemez. Bunun sonucunda da bakteriyel persistens ve replikasyonlar meydana gelebilmektedir (Ghigo ve ark 2001).

1.10. Klinik Bulgular

Q ateşi hastalığı dünya çapında görülebilen zoonotik bir enfeksiyondur. Etiyolojik ajanı olan *C. burnetii* ise obligat intrasellüler bir organizmadır. *C. burnetii* etkenini genel rezervuarları olan sığır, koyun ve keçiler bakteriyi idrar, dışkı, süt ve postpartum materyaller ile yaymaktadırlar. Kedi, köpek, tavşan gibi infekte pet hayvanları da hastalığın insanlara bulaşmasına ve salgınların şekillenmesine neden olabilmektedirler. İnsanlarda enfeksiyon genellikle kontamine aerosollerin inhalasyonu ile şekillenmektedir. Organizma yüksek derecede enfeksiyözdür ve potansiyel biyoterörizm ajanı olarak düşünülmektedir, ayrıca Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (OIE) tarafında Kategori B biyolojik ajan olarak sınıflandırılmaktadır (Madariaga ve ark 2003).

Çeşitli klinik belirtilere yol açmasından dolayı *C. burnetii* infeksiyonlarının prevalansı kesin olarak saptanamamaktadır ve laboratuvar çalışmalarına ağırlık verilmesi gerekmektedir. *C. burnetii*'ye karşı immunize olmayan bir birey, etkenle kontakt haline geldikten ve yaklaşık 3 haftalık inkubasyon periyodu geçtikten sonra primer infeksiyon semptomatik ya da asemptomatik olarak şekillenebilmektedir, böylece akut Q ateşi hastalığı ortaya çıkmaktadır (Bellamy ve ark 2001).

Kendini tekrarlayan ateşli hastalık, Q ateşinin en sık görülen klinik seklidir, semptomatik hastalarda, başlangıç anidir. Yorgunluk, yüksek ateş, miyalji, öksürük görülebilir. Q ateşinin en sık görülen klinik belirtisi yüksek ateştir. Q ateşi olan hastalarda, ateş 2-4 gün içinde 42°C'ye ulaşır. Plato yaptıktan sonra 5-14 gün içinde normale döner. Tedavi edilmeyen hastalarda ateş 57 güne kadar uzayabilir. Bu sebepten akut Q hurnması sebebi bilinmeyen ateşin bir nedenidir. Erişkin hastalarda ateş uzayabilmesine rağmen iki hafta içerisinde kademeli olarak düşer (Levy ve ark 1999).

Ateşli bir hastada ortaya çıkan pnömoni, Q ateşi pnömonilerinin en yaygın görülen şeklidir. Atipik pnömoni, daha çok gençlerde görülen, kuru öksürükle karakterize ve balgam kültürleri negatif olan klinik şekildir. Hastalık bazen sinsi, bazen de aniden başlar. Ateş her hastada vardır. Öksürük farklı şekillerde infekte hastaların % 24 ile %90'ında bildirilmiştir. En sık görülen fiziksel bulgu krepitan rallerdir. Hastaların % 5'inde splenomegali bulunur. Q ateşi pnömonisinin radyolojik bulguları değişiktir, yuvarlak, tek ya da multipl opasiteler, ateletazi ve plevral effüzyon şeklinde olabilir (Lovey ve ark 1999). Lökosit sayısı genellikle normal olmakla beraber hastaların üçte birinde yüksektir. Hastaların hemen hepsinde serum transaminaz seviyeleri 2-3 kat artmıştır, ikterus görülebilir, ancak serum bilirubini genellikle normaldir (Fenollar ve ark 2001).

Fransa gibi bazı ülkelerde hepatit, Q ateşinin en sık görülen klinik şeklidir. Hepatit genellikle serum transaminaz seviyelerinde 2-3 kat bir artış ile ortaya çıkar ve sıklıkla buna ateş, iştahsızlık, depresyon, kusma ve ishal eşlik etmektedir. İlerleyici ikterus ve hepatomegali genelde mevcuttur. Karaciğer dokusunun aşırı yıkımına bağlı hepatik koma ve ölümle sonuçlanan olgular bildirilmiştir (Ayres ve ark 1998).

Karaciğer biyopsisinde tipik "halka şeklinde" granulomlar görülür. Hepatitli hastalarda sıklıkla düz kas antikorları, anti-kardiyo-lipin antikorları, anti-fosfolipit antikorları,

sirkuler antikoagulan antikorlar ve antinukleer antikorlar pozitif bulunabilir (Ayres ve ark 1998).

Miyokardit, Q ateşinde nadir görülen ancak yaşamı tehdit edici bir klinik belirtidir. Hastaların % 5-11'inde görülmektedir. Hasta hayvanların çoğunda elektrokardiyografi ile tanı konulmaktadır. En sık görülen elektrokardiyografi bulgusu T- dalgası değişikliğidir. Hastalarda sıklıkla taşikardi, daha az olarak ventilator desteği gerektiren hipoksi ve kalp yetmezliği gelişir (Boyle ve ark 1999).

Perikarditis, akut Q ateşinde nadir görülür. Olguların çoğu İspanya'dan bildirilmiştir. Perikarditis akut Q ateşinde miyokarditis ya da plevritis ve kronik Q ateşinde çoğu kez endokarditis ile beraberdir. Klinik belirtiler spesifik değildir, ateş sıklıkla mevcuttur. En sık görülen elektrokardiyografi bulgusu T-dalgası değişikliğidir. Ekokardiyografi ile plevral effüzyon saptanabilir. Genellikle spontan düzelmekle beraber, tekrarlama eğilimindedir (Boyle ve ark 1999).

Coxiella burnetii ilk tanımlandığı zaman deri döküntülerinin olrnaması yüzünden, diğer Riketsiyalardan farklı bir etken olarak tanımlanmıştır. Son klinik çalışmalarda, Q ateşi olan olguların % 5-21'inde makul, papul ve purpura şeklinde deri döküntülerinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Brouqui ve ark 1993).

Kronik Q ateşinin en sık görülen klinik tablosu endokardittir. Olguların % 60 - 70'inde endokardit bulunur. İngiltere ve Galler'de 1975-1981 yılları arasında tanısı konulmuş tüm endokarditlerin % 3'ü, Fransa'da ise % 5'i Q ateşine bağlıdır. Endokardit spontan olarak ölüme neden olabilirse de uygun antibiyotik tedavisi ile mortalite % 10'dan daha az, tekrarlama oranı ise yaklaşık % 50 civarındadır (Brouqui ve ark 1993).

Çok basit ve duyarlılığı yüksek bir test olan IFAT Q ateşinin tanısında kullanılan referans bir testtir. Önemli bir avantajı çok az miktarda antijene gereksinim duyulması, Faz I ve Faz II'ye karşı oluşan IgG, IgM ve IgA antikorları saptayabilmesidir. Araştırmacılar IFAT testinin birçok laboratuarda uygulanabilen basit bir teknik olduğunu, ancak çok miktarda örnek için uygulanmasının kolay olmadığını, bu nedenle de epidemiyolojik araştırmalar için değil, bireysel bazda tanı için standart bir test olarak düşünülmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Waag ve ark 1995).

Son zamanlarda Coxiellozis tanısı için moleküler yöntemler, biyogüvenlik seviyesinin yüksek olması, tanıda zaman kaybetmeden sonuç vermesi ve antibiyotik tedavisine hemen başlanabilmesi açısından kullanımı yaygınlaşmıştır (Kırkan ve ark 2008). İzositrat dehidrogenaz genleri, süperoksit dismutaz genleri ve transpozon benzeri tekrarlayan bölgelerin belirlendiği PCR tabanlı teknikler de kullanılmaktadır. PCR yöntemi, biyolojik örneklerden *C. burnetii* identifikasyonu açısından kullanışlı bir metot olmaktadır. Tekrarlayan transpozon benzeri elementlerden meydana gelen primerler ile yapılan PCR uygulamalarında *C. burnetii* infeksiyonlarının tanısında yüksek derecede spesifite ve sensitivite elde edilmiştir. Bu uygulamalarda ayrıca çok düşük miktardaki spesifik DNA sekansları da saptanabilmektedir (Kırkan ve ark 2008).

1.11. Tedavi

Hafif veya subklinik olgular, antibakteriyel ilaçlara gerek olmadan kendiliğinden iyileşirler. Klinik olarak tanısı konulan hastaların hepsi tedavi edilmelidir. Antibakteriyel tedavi klinik tabloya göre değişmektedir. Atipik pnömonide, tedavi hastalığın ilk üç gününde başladığında etkili olmaktadır. Bu nedenle ciddi olgularda, serolojik tanı beklenmemelidir (Mejia ve ark 2000).

Tedavide ilk seçilecek antibiyotik tetrasiklin grubudur. Tetrasiklin (4 x 500 mg /gün), doksisisiklin (2 x 100 mg/gün), ayrıca kloramfenikol, kinolonlar, kotrimoksazol, rifampin ve eritromisin de klinik ve laboratuvar çalışmalarda etkili bulunmuştur. Tedavi süresi 15-21 gündür (Jorm ve ark 1990). Endokardit tedavisinde hem uygun kombinasyon hem de süre konusunda bir görüş birliği yoktur. Kronik Q ateşinde tedavi için kombine ilaç kullanılması gereklidir. Doksisisiklin + kotrimoksazol, doksisisiklin + rifampisin veya doksisisiklinin + kinolon kombinasyonlarından en az bir yıl kullanılması önerilmektedir. Hepatitiste iki haftalık antibiyotik tedavisinin yeterli olduğu bildirilmiştir (Tissot-Dupont ve ark 1992).

1.12. Korunma ve Kontrol

Ortaya çıkan infeksiyonlarda ana kaynak çiftlik hayvanlarıdır. Dünyanın bazı bölgelerinde hayvanların çoğu infekte olup süt, idrar, dışkı ve doğum sıvıları ile etkeni

ortama yaymaktadırlar. Hastalığa karşı korunma önlemleri, tıp ve veteriner hekimliğinin işbirliği ile yapılmalıdır. Herhangi bir salgın ortaya çıktığında hastalar, sağlam hayvanlardan ayrı olarak tedavi edilmelidir. İnfekte hayvanlarla ilişkide olan personelin sık sık enfeksiyonu alıp almadıkları da incelenmeli, infekte olanlar da tedavi edilmelidir. Pastörizasyon yüksek ısı yönteminde (70 °C / 15 saniye) yapılmalıdır. Özellikle doğum anında plasenta çok infekte olduğundan hemen imha edilmeli, ortamdan uzaklaştırılmalı, ortam sürekli olarak dezenfektanlar ile dezenfekte edilmeli ve hayvanların yaşadığı yerler enfeksiyon odağı olarak değerlendirilmelidir (Tissot-Dupont ve ark 1992).

Tez çalışmamızda, Q ateşi hastalığı etkeni *Coxiella burnetii*'nin sığır, koyun ve keçilerde varlığının serolojik, immunohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle araştırılması hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. Kan Örnekleri

Yapılan bu tez çalışmasında Aydın ili ve çevresinde bulunan dört adet farklı sığır, koyun ve keçi çiftliğinden, her çiftlikten 50'şer örnek olmak üzere 200 adet sığır, 200 adet koyun ve 200 adet keçiden kan örneği alınmak suretiyle üzere toplamda 600 adet örnekleme yapıldı.

2. 1. 2. Solusyonlar

2. 1. 2. 1. TAE Elektroforez Buffer

50x konsantrasyonda stok solusyon aşağıdaki gibi hazırlandı:

Tris Base.....	40 mM
Asetik Asit	20 mM
EDTA	1 mM

Buffer solusyonu olarak stoktan 20 ml alınıp distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı.

2. 1. 2. 2. Gel Loading Buffer (6 X)

Bromofenol mavisi.....	25 mg
Sukroz	4 g
H ₂ O	10 ml'ye

tamamlandı.

2.1.2.3. Serum Dilüent (Vircell®)

Protein stabilizeri ve proklin içeren mavi renkli fosfat buffer içeren kullanıma hazır 25 ml'lik solusyon serum dilüenti olarak kullanıldı.

2.1.2.4. IgG Pozitif Kontrol (Vircell®)

ELISA testi için proklin içeren 500 µl'lik üretici firma tarafından hazırlanan reajan pozitif kontrol olarak kullanıldı.

2.1.2.5. IgG Negatif Kontrol (Vircell®)

ELISA testi için proklin içeren 500 µl'lik üretici firma tarafından hazırlanan reajan negatif kontrol olarak kullanıldı.

2.1.2.6. IgG Cut-Off Kontrol (Vircell®)

ELISA testi için proklin içeren 500 µl'lik üretici firma tarafından hazırlanan reajan cut off kontrol olarak kullanıldı.

2.1.2.7. IgG Anti-Goat Konjugat (HRP) (Abcam®)

Proklin, % 0.2 bovin serum albumini ve % 0.2 fosfat buffer solusyonu içeren peroksidaz işaretli 1 mg/ml konsantrasyondaki üretici firma tarafından hazırlanan reajan, ELISA testinde konjugat olarak kullanıldı.

2.1.2.8. Substrat Solusyonu (Vircell®)

ELISA testi için tetrametilbenzidin içeren üretici firma tarafından hazırlanan 15 ml'lik reajan substrat solusyonu olarak kullanıldı.

2.1.2.9. Stop Solusyonu (Vircell®)

ELISA testi için 0.5 M sülfürik asit içeren üretici firma tarafından hazırlanan 15 ml'lik reajan, stop solusyonu olarak kullanıldı.

2.1.2.10. Wash Buffer (Vircell®)

ELISA testi için Tween-20 ve Proclin içeren üretici firma tarafından hazırlanan 50 ml'lik 20X konsantrasyondaki reajan, wash buffer olarak kullanıldı.

2.1.2.11. Fosfat Buffer Solusyonu (Vircell®)

IFA testi için toz halindeki pH 7.2'ye ayarlanmış olan fosfat buffer solusyonu, 1 litre steril distile suda çözülürülerek hazırlandı.

2.1.2.12. IgG Pozitif Kontrol (Vircell®)

IFA testi için sodyum azid içeren 200 µl'lik üretici firma tarafından hazırlanan reajan pozitif kontrol olarak kullanıldı.

2.1.2.13. IgG Negatif Kontrol (Vircell®)

IFA testi için sodyum azid içeren 200 µl'lik üretici firma tarafından hazırlanan reajan pozitif kontrol olarak kullanıldı.

2.1.2.14. IgG Anti-Goat Konjugat (FITC) (Abcam®)

%0.09 sodyum azid, % 0.2 bovin serum albumini ve % 0.2 fosfat buffer solusyonu içeren floresein işaretli üretici firma tarafından hazırlanan reajan, IFA testinde konjugat olarak kullanıldı.

2.1.2.15. Mounting Medium (Vircell®)

Sodyum azid içeren üretici firma tarafından hazırlanan buffer gliserol, IFA testinde slaytların üzerine lamel sabitlemek için kullanıldı.

2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf MasterCycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirildi.

2. 1. 3. 2. MgCl₂, Hot Start II Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM MgCl₂, Hot Start II Taq DNA polimeraz (5U) (Phire®), 10X Taq Buffer (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl) 100mM deoksiniükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas®) kullanıldı.

2. 1. 3. 3. Primerler

Coxiella burnetii genlerinin tespiti için araştırmamızda kullanılan primerler Çizelge 2. 1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. *Coxiella burnetii* genomunda transpozon benzeri tekrarlayan bölgede bulunan primer çiftleri (Lorenz ve ark 1998)

Primer	Sekans 5'–3'	Bant genişliği
Trans-I	TGG TAT TCT TGC CGA TGA C	687 bp
Trans-II	GAT CGT AAC TGC TTA ATA AAC CG	

2. 1. 4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Biorad® marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2. 1. 4. 1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Prona)	2 g
TAE (0,5x)	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3–5 dk. kaynatılan karışım, 50°C'ye kadar soğutuldu. Etidyum brömür ilave edildikten sonra, halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15–20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2. 1. 4. 2. Marker

Marker olarak 100 bp lik DNA ladder (Fermentas®) kullanıldı.

2. 1. 4. 3. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden önce görüntüleme için jelin boyanmasında Biochemica® marka % 1'lik Ethidium Bromür 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jel içerisine 5 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2. 1. 4. 4. Standart Suşlar

Anabilim Dalımız stoklarında bulunan, fenol ile inaktive edilmiş, purifiye ve liyofilize *C. burnetii* Nine Mile Faz I suşu standart suş olarak kullanılmıştır.

2. 2. Yöntem

2. 2. 1. Örneklerin Alınması

2. 2. 1. 1. Kan: Her kan örneği alınırken, juguler ven bölgesi su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı ve % 70'lik alkol ile silindi. Eller sabunla yıkandıktan sonra eldiven giyilip holder yardımı ile vena jugularis'ten steril kan ve serum tüpleri içine 10'ar ml miktarda alındı. Alınan örnekler, soğuk zincirde laboratuvara getirildikten sonra tam kan örnekleri -20 derin dondurucu içerisine kaldırılırken, serumların ayrılması için 5.000 rpm devirde diğer kan örnekleri 10 dakika santrifüj edildi.

2.2.2. ELISA Testi

Elde edilen tüm serum örneklerine ELISA testi uygulandı. ELISA testi için Vircell® marka kiti kullanılarak test prosedürü üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. Araştırmamızda testin konjugatı modifiye edilerek peroksidaz işaretli anti-goat IgG konjugatı (Abcam®) kullanıldı. ELISA testini prosedürü şu şekildedir:

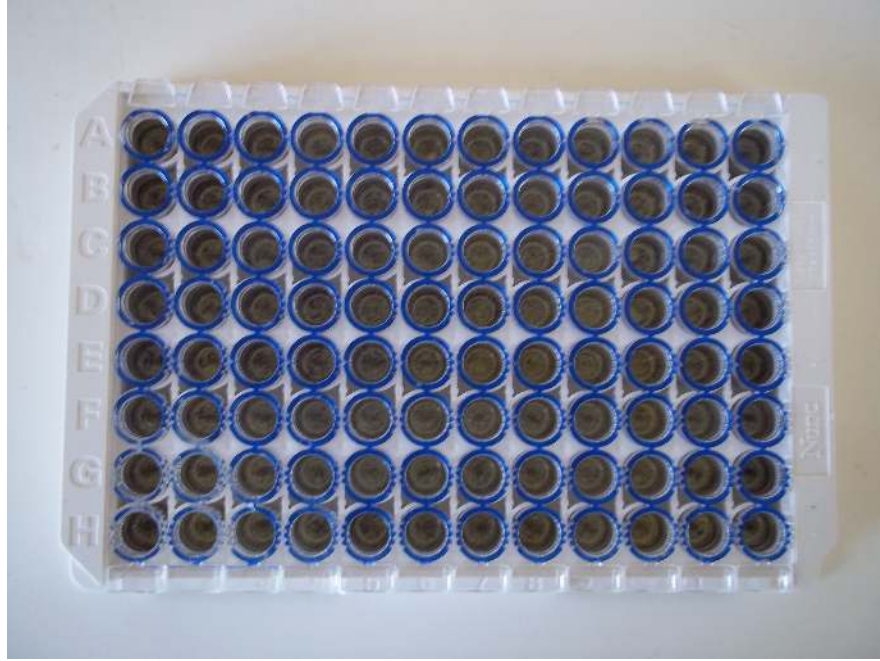
- *Ben mari 37°C'ye ayarlandı.
- *Bütün reajanların oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
- *Bütün reajanlar çalkalandı.
- *Pleytler paketten çıkarıldı, 2 kuyucuk cut off serum için, 1 kuyucuk pozitif kontrol için, 1 kuyucuk da negatif kontrol için ayrıldı.
- *Bütün kuyucuklara 100 µl serum dilüenti eklendi. 5 µl her örnekten, 5 µl pozitif kontrol, 5 µl negatif kontrol, 5 µl cut off kontrol kuyucuklara eklendi ve pleyt 2 dakika çalkalandı.
- *Pleytin üzeri kağıt ile kaplandı ve etüvde 37°C'de 45 dakika inkubasyona bırakıldı.
- *Pleyttteki sıvılar aspire edildi ve 0.3 ml yıkama solusyonu ile 5 kere yıkandı.
- *Hiç zaman kaybetmeden 100 µl peroksidaz işaretli 1/200 oranında sulandırılmış anti-goat IgG konjugatı (Abcam®) kuyucuklara eklendi.
- *Pleyt üzeri kaplı halde 37°C'de 30 dakika inkubasyona bırakıldı.
- *Pleyt üzerindeki kağıt çıkarıldı, sıvılar aspire edildi ve 0.3 ml yıkama solusyonu ile 5 kere yıkandı.
- *Hiç zaman kaybetmeden 100 µl substrat solusyonu kuyucuklara eklendi.
- *Oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 20 dakika inkubasyona bırakıldı.
- *Pleyt kuyucuklarına 50 µl stop solusyonu ilave edildi.
- *Pleytler 450-620 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede 1 saatlik stop reaksiyonundan sonra okundu. ELISA testi sonuçları ise Çizelge 2.2' belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.2. ELISA testi değerlendirme tablosu

İndeks	Değerlendirme
< 9	Negatif
9-11	Ekivokal
> 11	Pozitif



Resim 2.1. Çalışmada kullanılan ELISA test kiti



Resim 2.2. Çalışmada kullanılan ELISA pleyti

2.2.3. IFA Testi

IFA testi için Vircell® marka kiti kullanılarak test prosedürü üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

*Bütün re ajanlar oda sıcaklığına getirildi.

*10 µl serum örneği, 630 µl PBS ile sulandırıldı ve 1/64'lük serum dilüsyonu elde edildi.

*1/64'lük serum dilüsyonundan 20 µl slayt üzerindeki kuyucuklara eklendi. Pozitif ve negatif kontrol için aynı işlemler uygulandı.

*Slaytlar 37°C'de 30 dakika inkubasyona bırakıldı.

*Slaytlar PBS ile nazikçe yıkandıktan sonra 10 dakika PBS içeren şale içerisinde bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkandı.

*Slaytlar havada kurutuldu.

*Daha sonra 20 µl FITC işaretli 1/200 oranında sulandırılmış anti-goat IgG konjugatı (Abcam®) kuyucuklara eklendi.

*Slaytlar 37°C'de 30 dakika inkubasyona bırakıldı.

*Slaytlar PBS ile nazikçe yıkandıktan sonra 10 dakika PBS içeren şale içerisinde bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkandı.

*Slaytlar havada kurutuldu.

*Az miktarda mounting medium kuyucuklara eklendikten sonra slaytların üstü slip ile kapatıldı, slaytlar Leica® R-101 immun floresans mikroskopunda 400X büyütmede incelendi, UVP® Bioimaging görüntüleme programı ile slaytların fotoğrafları dijital ortama aktarıldı. Değerlendirmede mikroskopta elma yeşili floresans gösteren gram negatif kokobasillerin varlığı pozitif olarak kabul edildi, hiç floresans göstermeyen örnekler negatif olarak kabul edildi.



Resim 2.3. Çalışmada kullanılan IFA test kiti



Resim 2.4. Çalışmada kullanılan IFA slaytı

2. 2. 2. 2. Genotipik İdentifikasyon

DNA Ekstraksiyonu

Tam kan örneklerinden total DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

*200 µl kan örneği 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C’de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm.de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözündürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C’de bekletildi. 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra % 70’lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.



Resim 2.5. Çalışmada kullanılan DNA Ekstraksiyon kiti

2. 2. 2. 2. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tam kan örneklerinde *C. burnetii* geni varlığı incelendi. Tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq

enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 4 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 1,5 U, Template DNA (her bir örnek için) 300 nM olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 3. Mastermiksın hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek (µl)
Tag Buffer (10X)	1 X	5
MgCl ₂ (25mM)	4 mM	5
dNTP (10mM)	0.2 mM	1.25
Trans-I (100 pmol)	10 pmol	5
Trans-II (100 pmol)	10 pmol	5
Hot Start II Taq Polimeraz (5U)	2 U	0.4
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	23.35
Template DNA	300 nM	5
TOPLAM		50

Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 45'er µl hazırlanan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 5'er µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklenerek ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazına yüklenip, programlandı. *C. burnetii* gen analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Çizelge 2. 4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 4. Touchdown PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Denatürasyon	5	94°C	30 sn
Bağlanma		66 ± 1 (birbirini izleyen her basamakta sıcaklık 1°C düşürüldü)	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Denatürasyon		94°C	30 sn
Bağlanma		61°C	30 sn
Uzama	40	72°C	1 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2. 2. 2. 2. 2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklmesi

6x loading dye boyasından pipetin ucuna 3 µl kadar alınıp, daha sonra elde edilen 10 µl PCR ürünleriyle karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 10 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

2. 2. 2. 2. 3. Amplikonların Elektroforez Tankında Yürütülmesi

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 voltluk akımda 40 dk yürütüldü.

2. 2. 2. 2. 4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki (UVP® Bioimaging System, EC3 Chemi HR410, Almanya) odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirildi.

Değerlendirmede Trans-I ve Trans-II primerleri için 687 bp uzunluğunda bant arandı (Lorenz ve ark 1998).

3. BULGULAR

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresinde bulunan dört adet farklı sığır, koyun ve keçi çiftliğinden, her çiftlikten 50'şer örnek olmak üzere 200 adet sığır, 200 adet koyun ve 200 adet keçinin kan örneklerinden toplam 600 adet örnekleme yapılarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda *C. burnetii* varlığı yönünden ELISA, IFA ve PCR yöntemleri ile serolojik, immunohistokimyasal ve moleküler olarak incelendi.

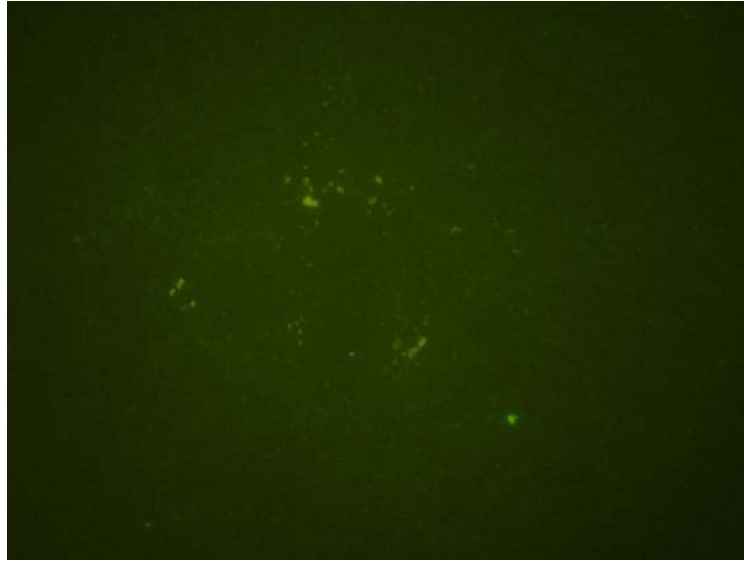
3.1. ELISA Bulguları

İncelenen 600 örneğin toplam 140'ında (% 23.33) *C. burnetii* antikorları saptanmıştır. Toplam 460 örnekte (% 76.77) ise *C. burnetii* antikorlarına rastlanmamıştır. Sığırlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 12, 3. çiftlikten 12, 4. çiftlikten 6 adet olmak üzere toplam 40 adet (% 20.0), koyunlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 14, 2. çiftlikten 17, 3. çiftlikten 11, 4. çiftlikten 16 adet olmak üzere toplam 58 adet (% 29.0), keçilerden elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 11, 3. çiftlikten 7, 4. çiftlikten 14 adet olmak üzere toplam 42 adet (% 21.0) olarak belirlenmiştir. (Çizelge 3.1).

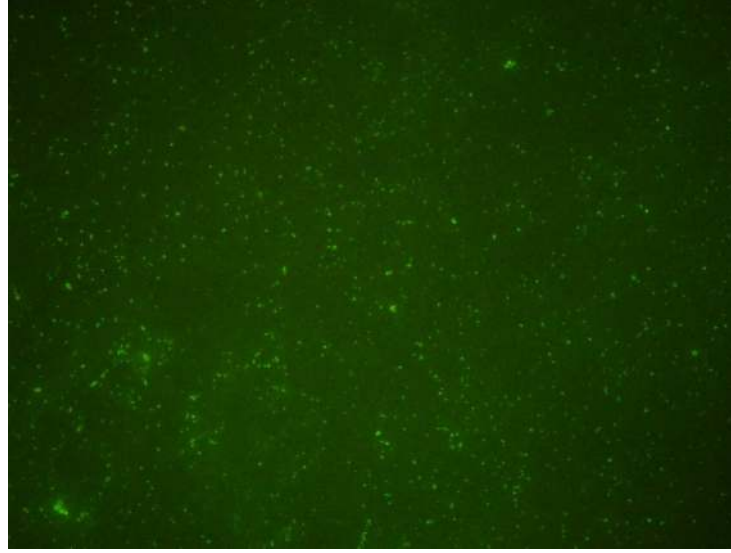
3.2. IFA Bulguları

İncelenen 600 örneğin toplam 148'inde (% 26.66) *C. burnetii* antikorları saptanmıştır. Toplam 452 örnekte (% 75.34) ise *C. burnetii* antikorlarına rastlanmamıştır. Sığırlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 12, 3. çiftlikten 12, 4. çiftlikten 10 adet olmak üzere toplam 44 adet (% 22.0), koyunlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 14, 2. çiftlikten 17, 3. çiftlikten 11, 4. çiftlikten 16 adet olmak üzere toplam 58 adet (% 29.0), keçilerden elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 12, 3. çiftlikten 9, 4. çiftlikten 15 adet olmak üzere toplam 46 adet (% 23.0) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

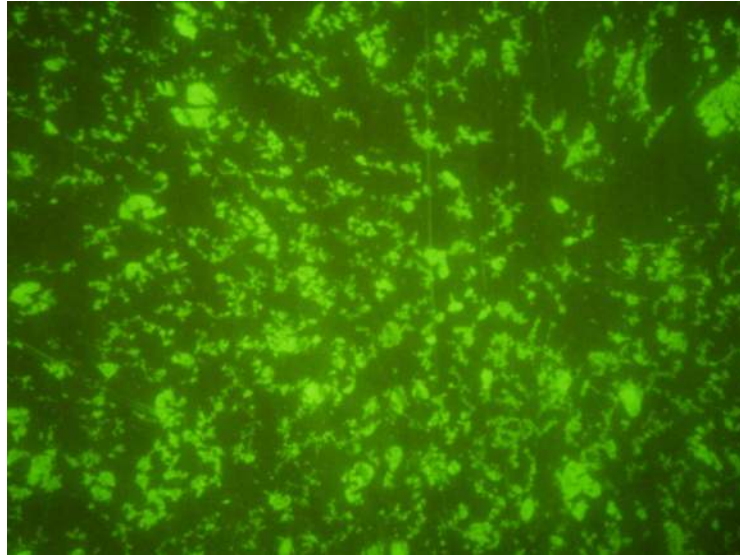
IFA testinin değerlendirmesinde ise floresansın yoğunluğuna göre +1, +2, +3, ve +4 olarak belirlenen örnekler, test kitinde belirtildiği gibi 1/64 titre ve üzeri olarak değerlendirilmiştir. IFA testi ile ilgili kullanılan kitin negatif ve pozitif kontrolleri ile IFA pozitif sığır örneği ile ilgili şekiller sırasıyla Resim 3.1., 3.2., 3.3.'te gösterilmektedir.



Resim 3.1. IFA negatif kontrol



Resim 3.2. IFA pozitif kontrol (1/64 titre)



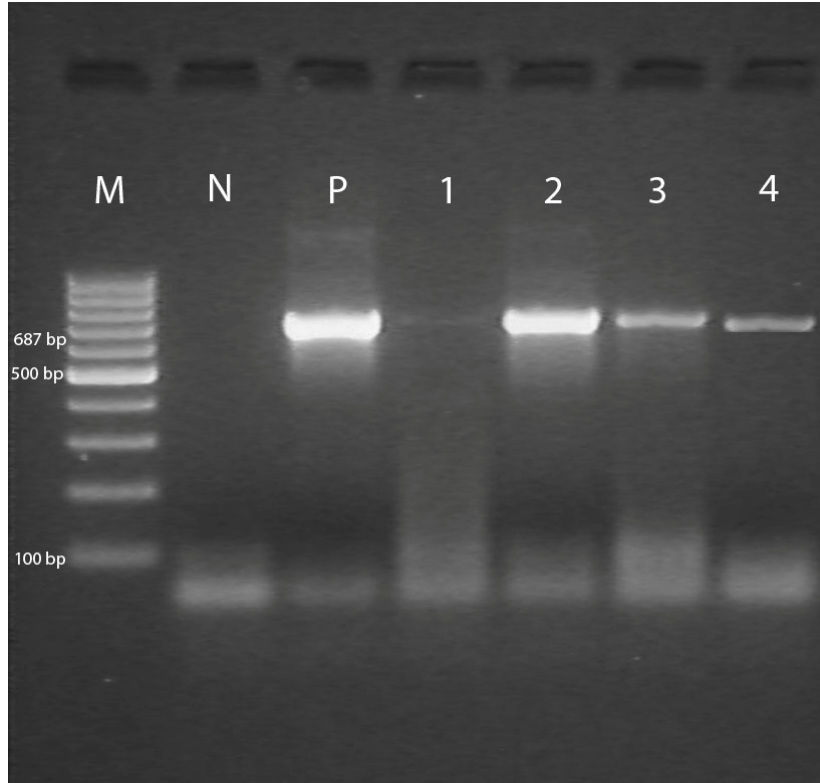
Resim 3.3. IFA pozitif sığır kan örneği (1/64 titre)

3.3. PCR Bulguları

Polimeraz zincir reaksiyonu ile aynı örnekler incelendiğinde toplam 600 adet örneğin 214'ünde (% 35.66) yaklaşık 687 bp fragment aralığında *C. burnetii* varlığı tespit edilmiştir (Resim 3.1). Sığırlardan elde edilen kan örneklerinde PCR pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 22, 2. çiftlikten 26, 3. çiftlikten 28, 4. çiftlikten 20 adet olmak üzere toplam 96 adet (% 48.0), koyunlardan elde edilen kan örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 17, 2. çiftlikten 20, 3. çiftlikten 15, 4. çiftlikten 20 adet olmak üzere toplam 72 adet (% 36.0), keçilerden elde edilen kan örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2.

çiftlikten 12, 3. çiftlikten 9, 4. çiftlikten 15 adet olmak üzere toplam 46 adet (% 23.0) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

C. burnetii varlığına yönelik elde edilen PCR görüntüleri Resim 3.4.'te gösterilmektedir.



Resim 3.4. Sığır, koyun ve keçi kan örneklerinde Trans-PCR ile *C. burnetii* varlığının tespiti - M: 100 bp işaretleyici; N: Negatif kontrol; P: *C. burnetii* Nine Mile pozitif kontrol; 1-2: Sığır kökenli *C. burnetii* pozitif örnekler; 3: Koyun kökenli *C. burnetii* pozitif örnek; 4: Keçi kökenli *C. burnetii* pozitif örnek.

Çizelge 3.1. *Coxiella burnetii* varlığının araştırılmasında kullanılan ELISA, IFA ve PCR testlerinin sonuçları

Örnekleme yapılan hayvan türü ve çiftlik numarası	Örnekleme sayıları	ELISA testi sonuçları		IFA testi sonuçları		PCR testi sonuçları	
		Pozitif Örnek Sayısı	Yüzde Oranı (%)	Pozitif Örnek Sayısı	Yüzde Oranı (%)	Pozitif Örnek Sayısı	Yüzde Oranı (%)
SÇ1	50	10	20	10	20	22	44
SÇ2	50	12	24	12	24	26	52
SÇ3	50	12	24	12	24	28	56
SÇ4	50	6	12	10	20	20	40
KoÇ1	50	14	28	14	28	17	34
KoÇ2	50	17	34	17	34	20	40
KoÇ3	50	11	22	11	22	15	30
KoÇ4	50	16	32	16	32	20	40
KeÇ1	50	10	20	10	20	10	20
KeÇ2	50	11	22	12	24	12	24
KeÇ3	50	7	14	9	18	9	18
KeÇ4	50	14	28	15	30	15	30
Toplam	600	140	23.33	148	24.66	214	34.66

SÇ1: Sığır çiftliği 1, SÇ2: Sığır çiftliği 2, SÇ3: Sığır çiftliği 3, SÇ4: Sığır çiftliği 4

KoÇ1: Koyun çiftliği 1, KoÇ2: Koyun çiftliği 2, KoÇ3: Koyun çiftliği 3, KoÇ4: Koyun çiftliği 4

KeÇ1: Keçi çiftliği 1, KeÇ2: Keçi çiftliği 2, KeÇ3: Keçi çiftliği 3, KeÇ4: Keçi çiftliği 4

4. TARTIŞMA

Q ateşi dünyanın pek çok yöresinde endemik olarak görülen bir hastalıktır. Bu hastalık hayvanlarda görülen ateşli hastalıkların öernli bir nedeni olarak tanımlanmıştır. Etkenin alınması genellikle inhalasyon yoluyla olmaktadır (Domingo ve ark 1999).

Hastalık etkeni olan *Coxiella burnetii*'nin patoenitesi çok fazla olup tek bir bakterinin solunum yolu ile alınması bile infeksiyonu başlatmak için yeterlidir. Ayrıca fiziksel ve kimyasal ajanlara oldukça dirençli oluşu ve diğer riketsiyalardan farklı olarak cansız çevrede uzun süre yaşayabilrnesi, hastalığın kontrolünde öernli bir engel oluşturmaktadır. *Coxiella burnetii*'nin primer rezervuarı sığır, keçi, koyun, köpek, at ve kenelerdir. Hastalık hayvanlarda genellikle subklinik seyretmekte, buna karşın mikroorganizma süt, idrar ve dışkı ile çok miktarda çıkarılmakta, ayrıca amniyotik sıvıda, plasenta ve fetal membranlarda yüksek oranda bulunrmaktadır. *C. burnetii*'nin infekte sığır, koyun ve keçilerden sağılan sütlerden ve tereyağından izole edildiğine dair pek çok yayın bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki pastörize edilmemiş sütler insanlar için *Coxiella* infeksiyonu kaynağı olabilmektedir (Andrews ve ark 1959).

Değişik klinik tablolar ile karşımıza çıkarak tanı güçlüğüne neden olan Q ateşinin spesifik laboratuvar tanısında kolay uygulanabilirliği ve laboratuvar çalışanlarına bulaşma riskinin olmaması nedeni ile serolojik tanı yöntemleri daha çok önerilmektedir. *Coxiella burnetii* antijenik Faz varyasyonu göstermektedir. Faz I organizmaları infekte insan ve hayvanlardan izole edilirken, Faz II organizmaları embriyolu yumurta sarı kesesinde veya in vitro hücre kültür sistemlerinde *C. burnetii*'nin seri pasajlarından sonra elde edilmektedir. Faz II antijenleri, infeksiyöz değildir, ancak gerek erken ve gerekse geç dönemde hasta serumları ile pozitif sonuç verebilmektedir. *Coxiella burnetii*'ye karşı gelişen antikorlar özgüldür ve diğer bakteriler ile çapraz reaksiyonlar bilinmemektedir. Q ateşi infeksiyonunda, spesifik IgM tipi antikorların pozitifliği akut veya yeni geçirilmiş bir infeksiyonu gösterir. IgG tipi antikorlar infeksiyonun erken döneminde yükselir ve yıllarca serumda saptanabilir kalmaktadır. Faz II antijen akut Q ateşinde ilk olarak ortaya çıkan antijen olup buna karşı oluşan antikorlar IgM türündedir. Kronik Q ateşinde ise yüksek düzeyde Faz I'e karşı antikorlar oluşmaktadır. *Coxiella burnetii*'ye karşı oluşan özgül

antikorların araştırılmasında sıklıkla ELISA ve IFAT kullanılmaktadır (Varga ve ark 1997). Komplement fiksasyon testi geçmişte Q ateşi tanısında çok kullanılmasına rağmen, ELISA ve IFAT'a göre duyarlılığının daha düşük olması, kronik infekte hastalarda yanlış negatif, tavuk yumurtasından hazırlanan antijenlerle çapraz reaksiyona girip yanlış pozitif sonuç vermesi ve daha uzun zaman alması nedeniyle son yıllarda pek kullanılmamaktadır. Bu testin duyarlılıklarını saptamak amacı ile yapılan çalışmalarda Peter ve arkadaşları (1985), ELISA için % 94, IFAT için % 91 ve KF testleri için % 78 oranlarında duyarlılık saptadıklarını bildirmişlerdir. Cruchaga D'Harcourt ve arkadaşları (1996), *C. burnetii* enfeksiyonu şüphesi olan hastalardan topladıkları 158 serum örneği ile ELISA ve IFAT testlerinin karşılaştırmalı çalışmasında >1/160 titrede ELISA için % 96.8 ve IFAT için % 98.4 oranında duyarlılık saptamışlardır.

ELISA ve IFA testlerinin duyarlılıkları oldukça yüksektir. Yine ELISA ve IFA testlerinin hemolitik ve anti-komplementer serumlarda uygulanabilmeleri bu testlere üstünlük kazandırmaktadır. Yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda IFAT ve ELISA'nın çok sayıda seruma uygulanabilmesi dışında birbirlerine üstünlükleri olmadığı bildirilmiştir (Domingo ve ark 1999). Araştırmamızda toplam 600 kan örneğinin 140'ında (% 23.33) ELISA pozitif, 148'inde (% 26.66) ise IFA testi pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen pozitif sonuçlar açısından ELISA ve IFA testlerimiz arasında yüksek oranda farklılık saptanmamıştır. Farklı çiftliklerden alınan örneklerin dağılımında ise sığır, koyun ve keçi populasyonlarında önemli derecede farklılık gözlenmemiştir. Sığır örnekleri açısından 4. çiftlikte IFA testinde 4 adet fazla pozitif örnek, keçi örnekleri açısından 2. ve 4. çiftlikten 1'er adet fazla pozitif örnek tespit edilmiştir. Koyun örnekleri açısından ELISA ve IFA testleri arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Q ateşi seroprevalansının, araştırılan hayvan türüne göre değişmek üzere % 9 ile % 21 arasında olduğu ve bölgesel olarak hayvan türleri arasındaki enfeksiyonun paralel seyrettiği bildirilmiştir (Uhaa ve ark 1994). Türkiye'de hayvanlarda Q ateşi varlığı ilk defa 1946-1947 yıllarında sütlerden *C. burnetii* izole edilmesiyle ortaya konmuştur (Çetinkaya ve ark 2000). Son yıllarda ülkemiz hayvanlarında Q ateşine yönelik yapılan seroprevalans çalışmalarında, değişik yörelerdeki hayvanlarda, *C. burnetii* seropozitifliği konusunda değişik sonuçlar bildirilmiştir. Elazığ'da yapılan bir çalışmada Çetinkaya ve arkadaşları (2000), *C. burnetii* IgG pozitifliğini koyunlarda % 10.5, sığırlarda da % 5.8 olarak bulmuşlardır. Kılıç ve arkadaşları, 2005 yılında Aydın'da koyunlarda *C. burnetii* IgG

seroprevalansının % 3.0, Seyitoğlu ve arkadaşları (2006) da yine 2005'te Erzurum'da prevalansının % 6.0 olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma sonuçları ülkemizin çeşitli yörelerindeki hayvanlarda *C. burnetii* infeksiyonunun varlığını göstermektedir. Özgür ve arkadaşları (1997), İstanbul ve Trakya yöresinde ELISA ile inceledikleri sığır serumlarından infertilite sorunu olan 92 sığırın 35 (%35.5)'inde, sağlıklı 52 süt sığırının 4 (%7.6)'ünde ve risk grubunu oluşturan 50 insan serumunun ise 23 (%46)'ünde antikor saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise Aydın ili ve çevresindeki sığır, koyun ve keçi popülasyonlarından ELISA testi sonucu *C. burnetii* IgG antikorları da saptanmıştır. ELISA testi sonucunda % 23.33 oranındaki seroprevalans dikkati çekmektedir.

Önceki çalışmalar (Lang ve ark 1990, Ho ve ark 1995, Maurin ve ark 1999) Q ateşinin çiftlik hayvanlarında yaygın olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, çiftlik hayvanlarındaki seroepidemiolojik çalışmaların çoğu 1960'larda yapılmıştır ve çoğu yerlerde bu hayvanlarda *C. burnetii* infeksiyonunun gerçek prevalansı hâlâ bilinmemektedir (Maurin ve ark 1999). Sığırlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalar *C. burnetii* antikor seroprevalansının 20-30 yıl öncesinden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Lang ve ark 1990). Sığır, koyun ve keçiler etkenin insanlara bulaşmasında primer rezervuarlardır (Maurin ve ark 1999). İnfekte hayvanların idrar, dışkı, süt ve doğum artıklarıyla mikroorganizma etrafa saçılır ve insanlara bulaşabilir. Koyun ve keçilerde yavru atma ve sığırlarda düşük doğum ağırlığı ve infertilite kronik *C. burnetii* infeksiyonu ile ilişkilidir (Ho ve ark 1995). Epidemiyolojik veriler süt veren ineklerin kronik olarak koyunlardan daha sıklıkla infekte olduğunu ve insan infeksiyonunun en önemli kaynağını oluşturduğunu göstermiştir (Maurin ve ark 1999). Koyunlarla karşılaştırıldığında infekte süt veren ineklerin serumundaki spesifik antikorların uzun süre saptanabildiği ve *C. burnetii*'nin sütle atılmasının uzun sürdüğü bildirilmiştir (Ho ve ark 1995). Çalışmamızda da Polimeraz Zincir Reaksiyonu metoduyla elde edilen verilere göre en fazla pozitif örnek sığırlardan elde edilmiştir. Bu durum da bölgemizde *C. burnetii* infeksiyonu tehlikesinin olduğunu ve infekte olan ve teşhis edilmeyen hayvanlardan alınan sütlerin tüketimi sonucu insanların da hastalığa yakalanmaya açık olduğunu desteklemektedir.

Amerika'da sığırlarda Q ateşinin seroprevalansı eyaletten eyalete değişiklik göstermekle birlikte, seroepidemiolojik çalışmalar son on yılda *C. burnetii* infeksiyonunun Amerika'daki sığırlar arasında arttığını göstermiştir (Kim ve ark 2005). Ayrıca, hastalık Amerika'da 1999'da rapor edildiğinden beri, insanlarda vakaların sayısı

belirgin bir şekilde artmıştır. Yeni bir çalışmaya göre, Q ateşi 1978-1999 yılları arasında 21 vakadan 2000-2004 yılları arasında 51 vakaya kadar artmıştır ve vakaların sayısının Kaliforniya’da en yüksek olduğu bildirilmiştir (McQuiston ve ark 2006). Bu veri Q ateşinin artık Amerika’da bir meslek hastalığı (çiftçiler, mezbaha çalışanları veya veteriner hekimler) olduğunun düşünülmesi gerektiğini göstermektedir. Son yıllarda, Irak ve Afganistan’a yerleşen Amerikan askerleri arasında Q ateşinin 30’dan fazla vakası bildirilmiştir (Leung-Shea ve ark 2006).

Türkiye’de hayvanlarda Q ateşinin yaygınlığı yapılan araştırmalarla ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar hastalığın hayvanlar ve insanlar için oluşturduğu riski ortaya koymuştur. Sığırlarda yapılan çalışmalarda seroprevalans oranının % 5.8- 21.7 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Gökçen 1989). Çetinkaya ve ark. (2000) Elazığ ili ve ilçelerinden sığır, koyun ve insanlardan toplanan serum örneklerinden Q ateşi seroprevalans çalışmasında, sırasıyla % 5.8 % 10.5 ve % 8 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Kalender (2001), Elazığ ve komşu illerdeki koyunlarda *C. burnetii* enfeksiyonunun yaygınlığını ortaya koymak amacıyla yaptığı çalışmada, yavru atmış koyunlarda % 38.6 ve yavru atmamış koyunlarda ise % 11 oranında seropozitiflik bulmuştur. Aynı araştırmacı Elazığ’da % 20.0, Malatya’da % 20.0, Bingöl’de % 28 ve Muş’ta % 27 oranlarında pozitiflik saptamıştır (Kalender 2001). Yine, Elazığ’daki koyunlardan alınan sütlerde immunomagnetik separasyon-PCR yöntemi ile, *C. burnetii* yönünden % 3.5 oranında bir pozitiflik bulunmuştur (Öngör ve ark 2004). Antalya, Diyarbakır ve Samsun il merkezlerinde toplanan serum örneklerinden Q ateşi seroprevalans çalışmasında, sırasıyla % 13.2, % 6.0 ve % 1,8 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Berberoğlu ve ark 2004). Aydın ve ark. (2006), İç Anadolu bölgesi sokak kedilerinde *C. burnetii*’nin seroprevalansını saptamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, Ankara’da % 1.4, Kayseri’de % 8.3 ve Niğde’de % 7.4 oranında seropozitiflik saptamışlardır. Çalışmamızda elde edilen verilere göre de Q ateşi hastalığının bölgemizdeki ağır, koyun ve keçi popülasyonlarında varlığı ortaya konmaktadır.

Eyigör ve arkadaşları (2006), çalışma grubunu veteriner hekimler, celepler ve kasapların oluşturduğu araştırmalarında serum örneklerinden ELISA yöntemiyle Faz II IgG ve IgM araştırmışlardır. ELISA testinde kuşkulu saptanan ve pozitif olan örneklerde de Faz I ve Faz II IgM ve IgG antikorlarını araştırmışlardır. Toplam 20 kişide yapılan IFA Faz II IgM testi yedi (% 7.6) olguda pozitif saptanmıştır. *C. burnetii* IgG antikorları ELISA

ile olguların 32'sinde (% 34.8) pozitif, dokuzunda (% 9.7) şüpheli bulunmuştur. Toplam 41 kişide uygulanan IFA testiyle, *C. burnetii* Faz II IgG antikorları 39 (% 42.3) kişide pozitif bulunmuştur. Bir kişide (% 2.4) IFA ile *C. burnetii* Faz I ve Faz II IgG birlikte pozitif saptanmıştır. Çeşitli çiftliklerden alınan kan örneklerinden elde ettiğimiz ELISA, IFA ve PCR bulgularına göre hastalığın zoonotik karakteri göz önüne alındığı zaman, bu çiftliklerde çalışan personel ve veteriner hekimlerin de Q ateşi hastalığı ile karşı karşıya kaldığı söylenebilmektedir.

Son yıllarda, Polimeraz Zincir Reaksiyonu insan ve veteriner hekimlikte Q ateşinin teşhisini önemli ölçüde değiştirmiştir. PCR kitleri mevcuttur ve farklı klinik örneklerde *C. burnetii*'yi saptamak için PCR testleri spesifik, duyarlı, yapılması kolay ve çabuk bir yöntemdir (Arricau-Bouvery ve ark 2005). Çok sayıda hayvan ve sürüleri test etmek için ELISA avantajlı bir testtir, fakat serolojik testler dışkı ve süt ile *C. burnetii*'yi saan hayvanları tespit etmede bazı dezavantajlara sahiptir (Arricau-Bouvery ve ark 2005). Çünkü vajinal mukus, dışkı veya sütle *C. burnetii*'yi dışarı çıkaran çoğu hayvanlar seropozitif olmasına rağmen, bir kısmı etkeni saçmadan seropozitif olabilir ve diğer taraftan seronegatif olanların bir kısmı da etkeni saçabilirler. PCR portörleri saptamak için en duyarlı ve çabuk yöntemlerden birisidir (Fournier ve ark 2003). Son yıllarda, hücre kültürlerinde ve klinik örneklerde *C. burnetii* DNA'sını saptamak için PCR'ı baz alan birkaç teşhis testi geliştirilmiştir. Bu testler konvansiyonel PCR (Edingloh ve ark 1999), nested PCR veya LightCycler, SYBR Green veya TaqMan chemistry ile yapılan real-time PCR'dır (Fenollar ve ark 2004). Tekrarlı ve transpozon benzeri elementi (Trans PCR) baz alan primerlerle yapılan bir PCR testi, *C. burnetii* infeksiyonlarının laboratuvar teşhisi için yüksek derecede spesifik ve duyarlıdır. Çünkü spesifik DNA sekansının çok az kopyasını bile saptamaktadır (Willems ve ark 1994). Trans PCR testinin hayvanların süt, dışkı ve dokularında *C. burnetii* DNA'sını saptamak için yüksek derecede duyarlı bir metot olduğu ispatlanmıştır (Willems ve ark 1994). Testlerin hedef sekansları com1 veya htpB gibi tek kromozomal genler, plazmidler (QpHI, QpRS) veya *C. burnetii* Nine Mile RSA 493 suşunun genomunda 20 kopyada mevcut olan IS1111 insersiyon elementin transposase geninden orijin almışlardır. IS1111 elementin multikopya sayısından dolayı, bununla yapılan PCR testi çok duyarlıdır. Bununla birlikte, farklı *Coxiella* izolatlarında mevcut olan IS1111 elementlerinin sayıları bilinmediği için, hücrelerin miktarı IS elementini baz alan PCR ile belirlenememektedir (Hoover ve ark 1992).

Son yıllarda PCR metodu, *C. burnetii* etkenlerinin belirlenmesinde kullanılan hızlı ve duyarlı metotlardan birisi olmaktadır. Konvansiyonel PCR yönteminde etkenin saptanma oranları serumda 1-500 bakteri/ml ve dışkıda ise 1 bakteri/mg seviyelerinde bulunmaktadır (Nicollet ve ark 2007). Kim ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmalarda ise 27kDa büyüklüğünde dış membran proteini olan htpA ve htpB proteinleri tespit edilmiştir. Jager ve arkadaşları ise (1998) restriksiyon fragment polimorfizmi analiz çalışmaları sonucu sığır, koyun ve keçi sütlerinde mucZ genlerini tespit etmişlerdir. Svaraka ve arkadaşları (2006) tarafından ortaya konulan multilokus değişken tandem tekrarlayan analiz yöntemiyle birlikte sekans tiplendirmesi açısından daha etkili sonuçlar elde edilebilmiştir. Glanzova ve arkadaşları (2005) ise multispacer sekans tiplendirmesi ile birlikte *C. burnetii* izolasyonuna gerek kalmadan klinik örneklerden etkenin varlığının ortaya konulabileceğini saptamışlardır. Çalışmamızda kullandığımız Trans-PCR metodu sonucunda ise sığır ve koyunlarda, ELISA ve IFA metoduna göre PCR metodunun daha spesifik sonuçlar verdiği ortaya konmuştur. Bu durumda da PCR metodunun güvenilirliği desteklenmektedir.

Schneeberger ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada ise 500 adet sığırdan elde edilen süt örneğinin 146 adedinde *C. burnetii*'ye ait ısı şok protein geni tespit edilmiş ve bu identifikasyonun klinik belirtilerin görülmesinden sadece 10 gün sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir. Hastalık genellikle subklinik infeksiyonlara yol açtığı için duyarlı ve hızlı teşhis için PCR metodunun önemi bir kez daha göz önüne gelmektedir.

Kırkan ve arkadaşları (2008)'da sığırlarda *C. burnetii*'nin varlığını moleküler olarak araştırdıkları çalışmalarında *C. burnetii*'ye ait transpozon benzeri tekrarlayan bölge genlerini saptamayı hedeflemişlerdir. DNA Ekstraksiyon kiti kullanılan araştırma sonucu toplam 138 örnekte 6 (% 4.3) adet örnek PCR pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmamızda da 600 adet hayvandan alınan kan örneklerinde % 34.66 oranında *C. burnetii* geni tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise ELISA testi açısından sığırlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 12, 3. çiftlikten 12, 4. çiftlikten 6 adet olmak üzere toplam 40 adet (% 20.0), koyunlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 14, 2. çiftlikten 17, 3. çiftlikten 11, 4. çiftlikten 16 adet olmak üzere toplam 58 adet (% 29.0), keçilerden elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 11, 3. çiftlikten 7, 4. çiftlikten 14 adet olmak üzere

toplam 42 adet (% 21.0) olarak belirlenmiştir. IFA testi açısından ise sığırlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 12, 3. çiftlikten 12, 4. çiftlikten 10 adet olmak üzere toplam 44 adet (% 22.0), koyunlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 14, 2. çiftlikten 17, 3. çiftlikten 11, 4. çiftlikten 16 adet olmak üzere toplam 58 adet (% 29.0), keçilerden elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 46 adet (% 23.0) olarak belirlenmiştir. Sığırlardan elde edilen kan örneklerinde PCR pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 22, 2. çiftlikten 26, 3. çiftlikten 28, 4. çiftlikten 20 adet olmak üzere toplam 96 adet (% 48.0), koyunlardan elde edilen kan örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 17, 2. çiftlikten 20, 3. çiftlikten 15, 4. çiftlikten 20 adet olmak üzere toplam 72 adet (% 36.0), keçilerden elde edilen kan örneklerinde pozitif örnek sayısı 1. çiftlikten 10, 2. çiftlikten 12, 3. çiftlikten 9, 4. çiftlikten 15 adet olmak üzere toplam 46 adet (% 23.0) olarak belirlenmiştir Çizelge . Görüldüğü üzere elde edilen pozitif sonuçlar açısından ELISA ve IFA testlerimiz arasında yüksek oranda farklılık saptanmamıştır. Ancak her iki test ile PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda özellikle sığır ve koyunlar açısından elde edilen sonuçlarda farklılıklar olduğu ve PCR ile daha fazla pozitiflik elde edildiği görülmektedir. *Coxiella burnetii* tanısında PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesinin ELISA ve IFA testlerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca her çiftlikten alınan örneklerin hayvan türlerine göre dağılımı göz önüne alındığında Aydın yöresi ve çevresinde *Coxiella burnetii* etkeninin var olduğu ortaya konmaktadır.

5. SONUÇ

Aydın ili ve çevresinde bulunan dört farklı sığır, koyun ve keçi sürülerinden elde edilen kan materyallerinde *C. burnetii*'nin serolojik, immunohistokimyasal ve moleküler identifikasyonu amacıyla yapılan bu tez çalışmasında, ELISA metoduyla incelenen 600 örneğin 140'ında (% 23.33) *C. burnetii* antikorları saptanmıştır. Aynı örnekler IFA metoduyla incelendiğinde 600 örneğin 148'inde (% 24.66) *C. burnetii* antikorları saptanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile örnekler incelendiğinde 600 örneğin 214'ünde (% 35.66) *C. burnetii* varlığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre sağlıklı görünen hayvanlardan alınan kanlardan *C. burnetii* varlığının tespitine yönelik en iyi identifikasyon metodunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu olduğu ortaya konulmuştur.

Bütün çiftliklerden alınan örneklerde sığır, koyun ve keçi populasyonlarında *C. burnetii* etkeninin varlığı ortaya konmuştur. Bu durumda Aydın ili ve çevresindeki ruminant yetiştiriciliği yapılan bölgelerde *C. burnetii*'ye yönelik araştırma sayısının artırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Q ateşi hastalığının zoonotik karakteri de göz önüne alındığı zaman, söz konusu bakteriyel etken ile mücadele edilmesinin önemi gündeme gelmektedir.

C. burnetii etkeni, genellikle subklinik olarak seyretmektedir ve pnömoni gibi hafif olgularla sonuçlansa da abortlara da yol açmakta ve verim kayıplarına neden olabilmektedir. Zoonotik özelliğinden dolayı da insanlarda da infeksiyonlara yol açma tehlikesi de bulunmaktadır. Tez çalışmamızda elde edilen verilerin ışığında, ruminant yetiştiriciliğinin yaygın olduğu Aydın ili ve çevresinde Q ateşi hastalığı şüphesi gösteren hayvanların serolojik sürü taramalarının ELISA ve IFA testleri ile yapılması, pozitif sonuçlar elde edilen çiftliklerde ise PCR metoduyla *C. burnetii* varlığının araştırılması sonucuna varılmaktadır. Bu çiftliklerdeki hasta hayvanların sütlerinin tüketime sunulmaması, portör hayvanların infeksiyonu yaymasını önlemek amacıyla sürüden ayrılması, çevreye kontamine dışkı ve altlık materyallerinin yayılmasının engellenmesi gerekmektedir.

Ülkemiz genelinde olduğu gibi Aydın bölgesinin de Q ateşi hastalığı salgını açısından riskli bir durumda olduğu ve özellikle Veteriner sahada aşısı ve toksoidi bulunmayan *C. burnetii* etkeni için immunizasyon çalışmalarının hızlandırılması ve koruma-kontrol önlemlerinin alınmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

ÖZET

Sığır, Koyun ve Keçi Sürülerinde *Coxiella burnetii* Yayılımının Saptanması

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresinde bulunan 4'er farklı çiftlikte bulunan 200 adet sığır, 200 adet koyun ve 200 adet keçinin her birinden kan alınmak üzere 600 adet örnekleme yapılarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda *C. burnetii* etkeninin varlığı yönünden serolojik ve moleküler olarak incelenmiştir.

ELISA yöntemine göre sığırlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 40 adet (% 20.0), koyunlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 58 adet (% 29.0), keçilerden elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 42 adet (% 21.0) olarak belirlenmiştir.

IFA yöntemine göre sığırlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 44 adet (% 22.0), koyunlardan elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 58 adet (% 29.0), keçilerden elde edilen serum örneklerinde pozitif örnek sayısı 46 adet (% 23.0) olarak belirlenmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemine göre sığırlardan elde edilen kan örneklerinde PCR pozitif örnek sayısı 96 adet (% 48.0), koyunlardan elde edilen kan örneklerinde pozitif örnek sayısı 72 adet (% 36.0), keçilerden elde edilen kan örneklerinde pozitif örnek sayısı 46 adet (% 23.0) olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre sağlıklı görünen hayvanlardan alınan kanlardan *C. burnetii* varlığının araştırılması için en duyarlı metodun Polimeraz Zincir Reaksiyonu olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *C. burnetii*, sığır, koyun, keçi, kan, ELISA, IFA, PCR

SUMMARY

Detection of *Coxiella burnetii* shedding in Bovine, Ovine and Caprine Herds

In this study, a total of 600 sampling was made from 200 cattle, 200 sheeps and 200 goats from 4 different ranch in Aydin Province region, then blood samples were brought to Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology and investigated serologically and molecularly for the presence of *C. burnetii*.

According to ELISA method, the number of positive samples gathered from sera samples of cattle were 40 (20%), the number of positive samples gathered from sera samples of sheeps were 58 (29%) the number of positive samples gathered from sera samples of goats were detected as 42 (21%).

According to IFA method, the number of positive samples gathered from sera samples of cattle were 44 (22%), the number of positive samples gathered from sera samples of sheeps were 58 (29%) the number of positive samples gathered from sera samples of goats were detected as 46 (23%).

According to Polymerase Chain Reaction method, the number of PCR positive samples gathered from blood samples of cattle were 96 (48%), the number of positive samples gathered from blood samples of sheeps were 72 (36%) the number of positive samples gathered from blood samples of goats were detected as 46 (23%).

According to the results obtained, Polymerase Chain Reaction is the most sensitive method for detecting *C. burnetii* from blood samples taken from animals which seems healthy.

Keywords: *C. burnetii*, cattle, sheep, goat, blood, ELISA, IFA, PCR

KAYNAKLAR

- Abdelrahman YM, Belland RJ.** The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev*; 29:949–959, 2005.
- Andrews PS, Marmion BP.** Chronic Q fever. *Br Med J*; 2: 983 – 985, 1959.
- Anonim.** Eriřim adresi: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2011>. Eriřim tarihi: 19.11.2011
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A.** Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res*; 36: 327-349, 2005.
- Atzpodien E, Baumgartner W, Artelt A.** Valvular endocarditis occurs as a part of a disseminated *Coxiella burnetii* infection in immunocompromised BALB/cJ (H-2d) mice infected with the Nine Mile isolate of *C. burnetii*. *J Infect Dis*; 170: 223–226, 1994.
- Aydın N, Çelebi B, Komiya T, Karatepe B, Babür C, Kılıç S.** İç Anadolu Bölgesi sokak kedilerinde *Coxiella burnetii* seroprevalansının araştırılması, VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslar arası Katılımlı) Bildiri Kitabı, Antalya, 26- 28 Eylül, Sayfa numarası: 200-201, 2006.
- Ayres JG, Flint N, Smith EG.** Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *Q J Med*; 91: 105–123, 1998.
- Baca OG, Paretsky D.** Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host–parasite interactions. *Microbiol Rev*; 47: 127–149, 1983.
- Baere PA, Samuel JE, Howe D.** Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol*; 188: 2309–2324, 2006.
- Bellamy RJ, Freedman AR.** Bioterrorism. *Q J Med*; 94: 227–234, 2001.
- Berberoğlu U, Gozalan A, Kılıç S, Kurtuğlu D, Esen B.** A seroprevalence study of in Antalya, Diyarbakir and Samsun provinces. *Mikrobiyol Bül*; 38: 385-391, 2004.
- Boehm U, Klamp T, Groot M.** Cellular responses to interferon. *Annu Rev Immunol*; 15: 749–795, 1997.
- Boyle B, Hone R.** Q fever endocarditis revisited. *Ir J Med Sci*; 168: 53–54, 1999.
- Brennan RE, Russell K, Zhang G.** Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections. *Infect Immun*; 72: 6666–6675, 2004.
- Brouqui P, Tissot Dupont H, Drancourt M.** Epidemiologic and clinical features of chronic Q fever: 92 cases from France (1982-1990). *Arch Intern Med* 153: 642-648, 1993.
- Capo C, Amirayan N, Ghigo E.** Circulating cytokine balance and activation markers of leucocytes in Q fever. *Clin Exp Immunol*; 115: 120–123, 1999.
- Clifton DR, Goss RA, Sahni SK.** NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 4646–4651, 1998.
- Colonna M, Pulendran B, Iwasaki A.** Dendritic cells at the host–pathogen interface. *Nat Immunol*; 7: 117–120, 2006.
- Cruchaga D'Harcourt S, Buno Soto A, Cascante Burgos V, Lozano Calero D, Martinez-Zapico R.** Comparison of Immunofluorescent with Enzyme Immunoassay for Detection of Q Fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 15: 749-752, 1996.

- Çetinkaya B, Kalender H, Ertas HB, Muz A, Arslan N, Ongor H, Gurcay M.** Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet Rec*; 29;146: 131-6, 2000.
- Dellacasagrande J, Capo C, Raoult D.** IFN-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol*; 162: 2259–2265, 1999.
- Dellacasagrande J, Moulin PA, Guilianelli C.** Reduced transendothelial migration of monocytes infected by *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*; 68: 3784–3786, 2000.
- Diaz Morant V, Mateo Sanchez JL, Lara Fernandez A, Cabello Rueda F.** Pleuropericarditis caused by Q fever. *An Med Interna*; 12: 568-569, 1995.
- Domingo P, Munoz C, Franquet T.** Acute Q fever in adult patients: report on 63 sporadic cases in an urban area. *Clin Infect Dis*; 29: 874–879, 1999.
- Echaniz A, Miguez E, Llinarez P, Diz-Lois F.** Recurrent pericarditis caused by Q fever. *Rev Clin Esp*; 191: 170-171, 1992.
- Edingloh M, Merck CC, Manz E.** Multiplex PCR for the diagnostic detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*; 112: 5-9, 1999.
- Eyigör M, Kırcan Ş, Gültekin B, Yaman S, Tekbıyık S, Aydın N.** Q Ateşi İçin Risk Gruplarında *Coxiella burnetii*'ye Karşı Oluşan Antikorların Elısa Ve İfa Testleri İle Saptanması *İnfeksiyon Dergisi* (Turkish Journal of Infection); 20 : 31-36, 2006.
- Feldman M, Zusman T, Hagag S.** Coevolution between nonhomologous but functionally similar proteins and their conserved partners in the *Legionella* pathogenesis system. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 12206–12211, 2005.
- Fenollar F, Fournier PE, Carrieri MP.** Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. *Clin Infect Dis*; 33: 312–316, 2001.
- Fenollar F, Fournier PE, Raoult D.** Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *J Clin Microbiol*; 42: 4919-4924, 2004.
- Fournier PE, Raoult D.** Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol*; 41: 5094-5098, 2003.
- Garduno RA, Garduno E, Hiltz M.** Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun*; 70: 6273–6283, 2002.
- Ghigo E, Capo C, Raoult D.** Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infect Immun*; 69: 2345–2352, 2001.
- Gimenez DF.** Staining *Rickettsiae* in yolk-sac cultures. *Stain Technol*; 39: 135–140, 1964.
- Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie T J and Raoult D.** *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerging Infectious Diseases*; 11: 1211-1217, 2005.
- Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N.** Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem*; 266: 19490–19498, 1991.
- Goosney DL, Gruenheid S, Finaly BB.** Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 16: 173–189, 2000.
- Gökçen SS.** Ege Bölgesi sığırları arasında Q-fever vakalarının yaygınlık derecesinin mikroagglütinasyon tekniği ile araştırılması. *Etlik Mikrobiyoloji Dergisi*; 6: 79-85, 1989.
- Grieshaber NA, Grieshaber SS, Fischer ER.** A small RNA inhibits translation of the histone-like protein Hc1 in *Chlamydia trachomatis*. *Mol Microbiol*; 59: 541–550, 2006.
- Gunn JS, Lim KB, Krueger J.** PmrA–PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol*; 27: 1171–1182, 1998.

- Guo L, Lim KB, Gunn JS.** Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science*; 276: 250–253, 1997.
- Heinzen RA, Grieshaber SS, Van Kirk LS.** Dynamics of actin-based movement by *Rickettsia rickettsii* in Vero cells. *Infect Immun*; 67: 4201–4207, 1999.
- Ho T, Htwe KK, Yamasaki N.** Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol Immunol*; 39: 663–671, 1995.
- Honstettre A, Ghigo E, Moynault A.** Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. *J Immunol*; 172: 3695–3703, 2004.
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC.** A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol*; 174: 5540–5548, 1992.
- Howe D, Barrows LF, Lindstrom NM.** Nitric oxide inhibits *Coxiella burnetii* replication and parasitophorous vacuole maturation. *Infect Immun*; 70: 5140–5147, 2002.
- Izzo AA, Marmion BP, Worswick DA.** Markers of cell-mediated immunity after vaccination with an inactivated, whole-cell Q fever vaccine. *J Infect Dis*; 157: 781–789, 1988.
- Jager C, Willems H, Thiele D, Baljer G.** Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiology and Infection*; 120: 157–164, 1998.
- Jorm LR, Lightfoot NF, Morgan KL.** An epidemiological study of an outbreak of Q fever in a secondary school. *Epidemiol Infect*; 104: 467–477, 1990.
- Kalender H.** Elazığ ve komşu illerdeki koyunlarda *Coxiella burnetii* enfeksiyonunun yaygınlığı. *Turk J Vet Anim Sci*; 25: 51–55, 2001.
- Kılıç S, Pasa S, Babur C, Ozlern MB.** investigation of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep in Aydin region Turkey, *Revue Med. Vet.*; 156: 336–340, 2005.
- Kırkan Ş, Kaya O, Tekbıyık S, Parın U.** Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by using PCR. *Turk J Vet Anim Sci*; 32: 215–220, 2008.
- Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E.** *Coxiella burnetii* in Bulk Tank Milk Samples, United States Emerging Infectious Diseases; 11: 619–621, 2005.
- Lang GH.** Coxiellosis (Q fever) in Animals. In: Marrie TJ (ed), *Q fever. I. The disease*. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc; 1990.
- Lautenschlager S, Willems H, Jager C.** Sequencing and characterization of the cryptic plasmid QpRS from *Coxiella burnetii*. *Plasmid*; 44: 85–88, 2000.
- Lem L, Riethof DA, Scidmore-Carlson M.** Enhanced interaction of HLA-DM with HLA-DR in enlarged vacuoles of hereditary and infectious lysosomal diseases. *J Immunol*; 162: 523–532, 1999.
- Leone M, Honstettre A, Lepidi H.** Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17-estradiol. *J Infect Dis*; 189: 339–345, 2004.
- Leung-Shea C, Danaher PJ.** Q fever in members of the United States armed forces returning from Iraq. *Clin Infect Dis*; 43: 77–82, 2006.
- Levy PY, Carrieri P, Raoult D.** *Coxiella burnetii* pericarditis: report of 15 cases and review. *Clin Infect Dis*; 29: 393–397, 1999.
- Literak I.** Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in blood donors in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*; 2: 52–4, 1994.
- Lorenz H, Cornelie J, Willems H, Baljer G.** PCR Detection of *Coxiella burnetii* from Different Clinical Specimens, Especially Bovine Milk, on the Basis of DNA Preparation with a Silica Matrix. *Appl. Environ. Microbiol*; vol. 64: 4234–4237, 1998.
- Lovey PY, Morabia A, Bleed D.** Long term vascular complications of *Coxiella burnetii* infection in Switzerland: cohort study. *Br Med J*; 319: 284–286, 1999.
- Lukacova M, Valkova D, Quevedo Diaz M.** Green fluorescent protein as a detection marker for *Coxiella burnetii* transformation. *FEMS Microbiol Lett*; 175: 255–260, 1999.

- Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM.** Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis*; 3: 709–721, 2003.
- Mandell F, Douglas T.** Principles and Practice of infectious Diseases. Five edition. New York: Churchill Livingstone; 2043-2050, 2000.
- Marrie TJ.** Acute Q fever. eRe Press, Inc., Boca Raton, Fla; 125-160, 1990.
- Maurin M, Raoult D.** Q fever. *Clin Microbiol Rev*; 12: 518–553, 1999.
- McCaul TF, Banerjee-Bhatnagar N, Williams JC.** Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect Immun*; 59: 3243–3253, 1991.
- McCaul TF, Williams JC.** Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol*; 147: 1063–1076, 1981.
- McQuiston JH, Holman RC, McCall CL, Childs JE, Swerdlow DL, Thompson HA.** National surveillance and the epidemiology of human Q fever in the United States, 1978 - 2004. *Am J Trop Med Hyg*; 75: 36- 40, 2006.
- Meconi S, Jacomo V, Boquet P.** *Coxiella burnetii* induces reorganization of the actin cytoskeleton in human monocytes. *Infect Immun*; 66: 5527–5533, 1998.
- Mejia A, Toursarkissian B, Hagino RT.** Primary aortoduodenal fistula and Q fever: an underrecognized association. *Ann Vasc Surg*; 14: 271–273, 2000.
- Meresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E.** Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol*; 1: 183–E188, 1999.
- Minnick MF, Heinzen RA, Douthart R.** Analysis of QpRS-specific sequences from *Coxiella burnetii*. *Ann NY Acad Sci*; 590: 514–522, 1990.
- Miller JD, Thompson HA.** Permeability of *Coxiella burnetii* to ribonucleosides. *Microbiology*; 148: 2393–2403, 2002.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*; 19: 683–765, 2001.
- Morimatsu K, Kowalczykowski SC.** RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell*; 11: 1337–1347, 2003.
- Nicollet P and Valognes A.** Current review of Q fever diagnosis in animals. *Bulletin De L Academie Veterinaire De France*; 160: 289-295, 2007.
- Nguyen SV, Hirai K.** Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol Lett*; 180: 249–254, 1999.
- Öngör H, Cetinkaya B, Karahan M, Açık MN, Bulut H, Muz A.** Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Vet Rec*; 154: 570-572, 2004.
- Özgür NY, Hasöksüz M, Yılmaz H, İkiz S, Ilgaz A.** Detection of antibodies to *Coxiella burnetii* in cattle with infertility problems and human sera by ELISA and its seroprevalence. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg*; 28: 207-218, 1997.
- Pentilla IA, Harris RJ, Storm P.** Cytokine dysregulation in the post-Q-fever fatigue syndrome. *Q J Med*; 91: 549–560, 1998.
- Peter O, Dupuis G, Burgdorfer W.** Evaluation of the complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the early diagnosis of primary Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 4: 394-396, 1985.
- Pissowotzki K, Mansouri K, Piepersberg W.** Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes strELMB2N. *Mol Gen Genet*; 231: 113–123, 1991.

- Punda-Polic V, Leko-Grbic J, Radulovic S.** Prevalence of antibodies to rickettsiae in the north-western part of Bosnia and Herzegovina. *Eur J Epidemiol*; 11: 697-9, 2005.
- Raetz CR, Whitfield C.** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*; 71: 635–700, 2002.
- Ripoll MM, Gomez-Mendieta MA, Gomez-Cerezo J, Molina F.** Pericarditis recidivante por fiebre Q. *Enferm. infec. Microbiol Clin*; 15: 168, 1997.
- Sabatier F, Dignat-George F, Mege JL.** CD4 T-cell lymphopenia in Q fever endocarditis. *Clin Diagn Lab Immunol*; 4: 89–92, 1997.
- Samuel JE, Kiss K, Varghees S.** Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era. *Ann NY Acad Sci*; 990: 653–663 2003.
- Sanford SE, Josephson GKA, MacDonald A.** *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goats after attendance at an annual fair. *Can Vet J*; 35: 376–378, 1994.
- Sanzo JE, Garcia-calabuig MA, Audicana A, Dehesa V.** Q fever prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in the Basque Country. *Int J Epidemiol*; 22: 1183-1187, 1993.
- Sauer JD, Bachman MA, Swanson MS.** The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 9924–9929, 2005.
- Schneeberger PM, Hermans MHA, van Hannen EJ, Schellekens JJA, Leenders ACAP, Wever PC.** Real-time PCR on serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clinical Vaccine Immunol*; 454-09, 2009.
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA.** Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100: 5455–5460, 2003.
- Sexton JA, Vogel JP.** Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 2002; 3(3):178–185. Mo YY, Cianciotto NP, Mallavia LP. Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiology*; 141: 2861–2871, 1995.
- Seyitoğlu F, Özkurt Z, Okumuş B.** The seroprevalance of Coxiellosis in Farmers and cattle in Erzurum District in Turkey. *Turk J Vet. Anim Sci*; 30: 71-75, 2006.
- Shannon JG, Howe D, Heinzen RA.** Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 8722–8727, 2005.
- Silver SS, McLeish WAD.** "Doughnut" granulomas in Q fever, *Can Med Assoc J*; 130: 102-104, 1984.
- Sixl W, Sixl VB.** Reserach on a possible Q fever infection in humans and animals on the cap verde Islands (Santa Cruz/Santiago), West Africa, *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*; 31, 1987.
- Suhan ML, Chen SY, Thompson HA.** Transformation of *Coxiella burnetii* to ampicillin resistance. *J Bacteriol*; 178: 2701–2708, 1996.
- Stein A, Lepidi H, Mege JL.** Repeated pregnancies in BALB/c mice infected with *Coxiella burnetii* cause disseminated infection, resulting in stillbirth and endocarditis. *J Infect Dis*; 181: 188–194, 2000.
- Stoker MG, Marmion BP.** The spread of Q fever from animals to man: the natural history of a rickettsial disease. *Bull WHO*; 13:781–806, 1995.
- Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan W.** Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett*; 254: 268-74, 2006.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S.** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*; 21: 335–376, 2003.
- Thompson HA, Suhan ML.** Genetics of *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett*; 145: 139–146, 1996.

- Tissot-Dupont H, Raoult D, Brouqui P.** Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med*; 93: 427–434, 1992.
- Toman R, Skultety L, Ftacek P.** NMR study of virenose and dihydrohydroxystreptose isolated from *Coxiella burnetii* phase I lipopolysaccharide. *Carbohydr Res*; 306: 291–296, 1998.
- Tselentis Y, Gikas A, Kofteridis D, Kyriakakis Tsaparas N.** Q fever in the Greek island of Crete: epidemiologic, clinical, and therapeutic data from 98 cases. *Clin Infect Dis*; 20: 1311–6, 1995.
- Uhaa I J, Fishbein DB, Olson JG, Rives CC, Waag DM, Williams JC.** Evaluation of specificity of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human Q fever. *J Clin Microbiol*; 32: 1560–1565, 1994.
- Valkova D, Kazar J.** A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol Lett*; 125: 275–280, 1995.
- Varga V.** An explosive outbreak of Q-fever in Jedľove Kostol'any, Slovakia. *Cent Eur J Public Health*; 4: 180–182, 1997.
- Varghees S, Kiss K, Frans G.** Cloning and porin activity of the major outer membrane protein P1 from *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*; 70: 6741–6750, 2002.
- Veras PS, Moulija C, Dauguet C.** Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun*; 63: 3502–3506, 1995.
- Vogel JP, Isberg RR.** Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr Opin Microbiol*; 2: 30–34, 1999.
- Vogel JP.** Turning a tiger into a house cat: using *Legionella pneumophila* to study *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol*; 12: 103–105, 2004.
- Von M, Baumgartner P, Eskens W.** Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle. *J Comp path*; 109: 295, 1993.
- Waag D, Chulay J, Marrie T.** Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 14: 421–427, 1995.
- Wahl C, Oswald F, Simnacher U.** Survival of *Chlamydia pneumoniae*-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-B binding activity. *Infect Immun*; 69: 7039–7045, 2001.
- Webster JP, Lloyd G, MacDonald DW.** Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitology*; 110: 31–35, 1995.
- Weinberg ED.** Modulation of intramacrophage iron metabolism during microbial cell invasion. *Microbes Infect*; 2: 85–89, 2000.
- Westlake P, Price LM, Kelly JK.** The pathology of Q fever hepatitis: a case diagnosed by liver biopsy. *J Clin Gastroenterol*; 9: 357–363, 1987.
- Willems H, Thiele D, Frolich-Ritter R, Krauss H.** Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zentralbl Veterinarmed B*; 41: 580–587, 1994.
- Wyrzykowski J, Volkert MR.** The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. *J Bacteriol*; 185: 1701–1704, 2003.
- Yoshiie K, Matayoshi S, Fujimura T.** Induced production of nitric oxide and sensitivity of alveolar macrophages derived from mice with different sensitivity to *Coxiella burnetii*. *Acta Virol*; 43: 273–278, 1999.
- Zamboni DS, Rabinovitch M.** Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect Immun*; 71: 1225–1233, 2003.
- Zhang L, Radziejewska-Lebrecht J, Krajewska-Pietrasik D.** Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Mol Microbiol*; 23: 63–76, 1997.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Aydın’da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Aydın’da tamamladım. 2001 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım. 2006 yılında Veteriner Fakültesi’nden mezun olduktan sonra Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimime aynı yıl içinde başladım. 2008 yılında ERASMUS programı ile Macaristan’da bulunan Szent Istvan Üniversitesi Veteriner Akademisi’nde 6 ay süre ile çalışmalarına devam ettim. Aynı yıl içinde Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programını tamamladım. 2008 yılının güz yarısında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dalı Doktora programına başladım. Yabancı dil olarak “İngilizce” bilmekteyim.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Prof. Dr. Osman KAYA'ya, 2006 yılından bugüne kadar olan akademik gelişimimde desteğini aldığım Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a, araştırmamın aşamalarında desteklerini esirgemeyen ve laboratuvarlarında çalışmama izin veren ADÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan EREN'e ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ'e, kanların toplanmasında destek sağlayan Uzm. Vet. Hek. Deha Ali DENİZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca doktora tezi çalışmalarımda desteklerini gördüğüm tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.