

# Endokarditli Bir Olgudan *Coxiella burnetii*'nin Türkiye'de İlk İzolasyonu; Antijen Üretimi ve Faz Değişimi Çalışması

## First Isolation of *Coxiella burnetii* in Turkey from a Patient with Endocarditis; Antigen Production and Phase Change Study

Bekir ÇELEBİ<sup>1</sup>, Bülent BAŞ<sup>2</sup>, Elif AGÜLOĞLU BALI<sup>3</sup>, Serap ŞİMŞEK YAVUZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı, Ankara.

<sup>1</sup> Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Zoonotic and Vector-borne Diseases Department, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>3</sup> İstanbul University İstanbul Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, İstanbul, Turkey.

**Makale Atfı:** Çelebi B, Baş B, Ağuloğlu Bali E, Şimşek Yavuz S. Endokarditli bir olgudan *Coxiella burnetii*'nin Türkiye'de ilk izolasyonu; antijen üretimi ve faz değişimi çalışması. Mikrobiyol Bul 2019;53(3):274-284.

### ÖZ

*Coxiella burnetii*, zoonotik bir enfeksiyon olan Q ateşinin etiyolojik etkenidir. Gram-negatif, pleomorfik, kokobasil şeklinde, konak hücrenin fagolizozomlarında üreme yeteneğine sahip olan bir bakteridir. Morfolojik olarak, küçük hücreli varyantı ve büyük hücreli varyantı olmak üzere iki hücre tipine sahiptir. *C.burnetii* hücre duvarındaki LPS yapısına göre serolojik olarak faz I ve faz II varyantı olarak da ikiye ayrılmaktadır. Faz I, enfekte hayvanlarda ve insanlarda bulunan doğal fazdır ve oldukça virülandır. Faz II ise virülan değildir ve sadece hücre kültürlerinde veya embriyonlu tavuk yumurtası kültürlerinde seri pasajlardan sonra laboratuvarlarda elde edilebilir. Akut Q ateşi, insanların %50'sinde asemptomatik seyrederken, semptomatik seyrettiği kişilerde en sık grip benzeri klinik tablo, atipik pnömoni ve hepatit ile kendini göstermektedir. Olguların küçük bir kısmında hastalık kronikleşebilir, kronik Q ateşinde en sık görülen klinik tablo endokardittir. Bu çalışmada, *C.burnetii* faz I varyantından, faz değişimi çalışması yapılarak *C.burnetii* faz II varyantı elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, endokardit tanısı alan bir hastanın kalp kapakçığı dokusundan, hücre kültürü yöntemi ile *C.burnetii* izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen süştan indirekt floresan antikor testi (IFAT) için *C.burnetii* faz I antijeni hazırlanmıştır. *C.burnetii* izolasyonu ve tanımlanması için takip eden işlemler uygulanmıştır. Kalp kapakçığı dokusu homojenize edilmiş ve doku ekstraksiyon kiti ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Doku DNA'sında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi ile *C.burnetii* PCR pozitif bulunmuştur. *C.burnetii* PCR pozitif doku örneği, Vero hücre kültürüne shell vial santrifügasyon yöntemi ile inoküle edilmiştir. Bir hafta inkübasyondan sonra kaldırılan Vero hücreleri IFAT lamlarına fikse edilmiş ve *C.burnetii* faz I IgG pozitif serum kullanılarak IFAT çalışılmıştır. Mikroskopik alanda, Vero hücrelerinde üremiş ve hücrelerin etrafını sarmış elma yeşili renkte bakteriler gözlenmiştir. Enfekte hücreler dondurma ve çözme işlemi ile parçalanarak bakteri süspansiyonu elde edilmiştir.

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Bekir Çelebi, Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Adnan Saygun Caddesi No: 55, 06100, Sıhhiye, Ankara, Türkiye.

**Tel (Phone):** +90 312 565 6382, **E-posta (E-mail):** vetbekir@yahoo.com

miştir. Bakteri süspansiyonundan elde edilen DNA tekrar *C.burnetii* Rt-PCR çalışılarak PCR sonucu pozitif belirlenmiş ve klinik örneğe göre daha erken sikluda pozitiflik tespit edilerek üreme doğrulanmıştır. İzolatımızdan elde edilen DNA ile 27F ve 1492R primerleri kullanılarak *Coxiella* 16S ribozomal RNA bölgesi PCR uygulanmış ve PCR ürünün DNA dizi analizi yapılarak elde edilen nükleotit dizileri GenBank'ta referans nükleotit dizileri ile karşılaştırılmıştır. İzolatımızın 16S ribozomal RNA nükleotit dizilişi, erişim numarası NR104916 olan *Coxiella burnetii* suşu ATCC VR-615 ile %99 benzer bulunmuştur. Kalp kapakçığından izole ettiğimiz *C.burnetii* izolatımız 16S ribozomal RNA dizi analizi ile de doğrulanmıştır. Suştan seri hücre kültürü pasajları yapılarak *C.burnetii* faz I varyantından *C.burnetii* faz II varyantı elde edilmeye çalışılmıştır. Her pasajdan sonra *C.burnetii* faz I ve faz II IgG pozitif serumlar ile IFAT uygulanarak faz değişimi gözlenmeye çalışılmıştır. Seri olarak yapılan 17 hücre kültürü pasajı sonunda faz değişimi gözlenmemiştir. Elde edilen bakteri süspansiyonlarından *C.burnetii* faz I IFAT antijeni hazırlanmıştır. Bu çalışmada, ülkemizde ilk defa endokarditli bir hastanın kalp kapakçığından hücre kültürü yöntemiyle *C.burnetii* izolasyonu ve izolatin moleküler, serolojik yöntemlerle tanımlanması sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Coxiella burnetii*; endokardit; hücre kültürü.

## ABSTRACT

*Coxiella burnetii* is the causative agent of Q fever, a zoonotic infection. The bacteria is a gram-negative, pleomorphic, coccobacilli and capable to survive and proliferate within the host cell's phagolysosome. There are two morphological cell types of *C.burnetii* including small and large cell variants. *C.burnetii* is divided into phase I and phase II serologically variants according to LPS structure in the cell wall. Phase I is the natural phase found in infected animals or humans and is highly infectious. Phase II is not very infectious and could be obtained only in laboratories after serial passages in cell cultures or embryonated egg cultures. Q fever can be asymptomatic (in 50% of the cases), acute or chronic. Major presentations of acute Q fever are flu-like illness, pneumonia, and hepatitis, whereas the chronic form presents mainly as infective endocarditis. The aim of this study was to obtain *C.burnetii* phase II variant from *C.burnetii* phase I variant by a phase change study. In this study, *C.burnetii* was isolated by cell culture method from the heart valve tissue of a Q fever endocarditis case. *C.burnetii* phase I antigen for the indirect fluorescent antibody test (IFAT) was prepared from the isolated strain. For the isolation and identification of *C.burnetii*, heart valve tissue of the patient was homogenized and DNA was extracted by tissue extraction kit. *C.burnetii* DNA in the valve tissue was determined by real-time PCR (Rt-PCR). This *C.burnetii* DNA positive specimen was inoculated into Vero cells by shell vial centrifugation method. The scraped Vero cells were fixed on the slides after one week of incubation and IFAT was performed using *C.burnetii* phase I IgG positive sera, bacteria that were grown in and surrounding the Vero cells stained apple green were determined microscopically. Infected cells were disrupted by freeze and thaw method to obtain bacterial suspension. The DNA obtained from the bacterial suspension was again found to be positive for *C.burnetii* by Rt-PCR. Isolation sample was found to be positive in PCR at an earlier cycle compared to heart tissue sample, thus the bacterial growth was also confirmed with PCR. 16S ribosomal RNA gene of our isolate was amplified by PCR using 27F and 1492 primers and then sequenced. The DNA sequences were compared with reference DNA sequences of GeneBank; and the nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of our isolate was found to be 99% similar to *C.burnetii* strain ATCC VR-615 an accession number NR104916. Serial cell culture passages of the isolated strain were performed to obtain *C.burnetii* phase II variant from *C.burnetii* phase I variant. After each passage, presence of phase change was investigated by IFAT using *C.burnetii* phase I and phase II IgG positive sera. At the end of 17 cell culture passages, phase change could not be observed. *C.burnetii* phase I IFAT antigen was prepared from the obtained bacterial suspension. In this study, we presented the isolation and identification of *C.burnetii* by cell culture, molecular and serological methods from the heart valve of a patient with endocarditis for the first time in our country.

**Keywords:** *Coxiella burnetii*; endocarditis; cell culture.

## GİRİŞ

*Coxiella burnetii*, *Legionellales* takımında, *Coxiellaceae* ailesinde, gram-negatif, pleomorfik, kokobasil şeklinde, konak hücrenin fagolizozomlarında üreme yeteneğine sahip bir bakteridir. Küçük hücreli varyantı ve büyük hücreli varyantı olmak üzere morfolojik olarak iki hücre tipine sahiptir<sup>1</sup>. *C.burnetii*'nin küçük hücre varyantı, hücre dışında uzun süre canlı kalmasını sağlayan, çevresel koşullara dayanıklı bir yapıya dönüşmüş halidir. Küçük hücre varyantı, enfekte hücre fagozomunda üreme fazında büyük hücre varyantına dönüşür ve çevresel şartlara dayanıklı değildir. *C.burnetii* küçük hücre varyantı, çevresel etkilere karşı dayanıklı olması, küçük yapısı (0.2-0.4 µm genişlik, 0.4-1.0 µm uzunluk) ile kolay aerosolize olması ve hava yolu ile kolay taşınması nedeniyle solunum yoluyla bulaşta önemlidir<sup>2,3</sup>. *C.burnetii*'nin virülans faktörleri, konak hücre içinde üreyebilmeleri ve hücre duvarındaki lipopolisakarit (LPS) yapısıdır. *C.burnetii* hücre duvarındaki LPS yapısına göre serolojik olarak faz I ve faz II varyantı olarak da ikiye ayrılmaktadır. *C.burnetii* faz I, konakçuları için virülanken *C.burnetii* faz II avirülandır. Faz I virülan form hücre kültürüne ve embriyonlu tavuk yumurtasına seri pasajlarda, bakteri genomundaki delesyona bağlı, LPS yapısında kayıplar sonucunda avirülan *C.burnetii* faz II varyantına dönüşmektedir<sup>4,5</sup>. *C.burnetii* faz II varyantında LPS yapısındaki değişim, etkeni komplemana karşı duyarlı hale getirirken, *C.burnetii* faz I komplemanın membran atak kompleksine dirençli durumda kalmaktadır. Ayrıca faz I varyantındaki LPS, *C.burnetii*'nin yüzey protein epitoplarına antikörlerin bağlanmasını engellemektedir<sup>6</sup>.

*C.burnetii*, zoonotik bir enfeksiyon olan Q ateşinin etkenidir. Q ateşi ilk defa 1936'da Avustralya'da mezbahane çalışanlarında tanımlanmıştır. Akut Q ateşi, insanların %50'sinde asemptomatik seyrederken, semptomatik seyrettiği kişilerde en sık grip benzeri klinik tablo, atipik pnömoni ve hepatit ile kendini göstermektedir. Olguların küçük bir kısmında hastalık kronikleşebilir, kronik Q ateşinin en sık klinik görünümü endokardit olarak bildirilmiştir. Akut olgularda inkübasyon dönemi etkenin alınan dozuna bağlı olarak birkaç gün ile birkaç hafta arasında değişirken, kronik olgular aylar sonra gözlenebilmektedir<sup>1</sup>.

*C.burnetii*, koyun, keçi, sığır gibi hayvanların idrar, dışkı, süt, doğum atıkları (plesanta, amniyotik sıvı) ve abort atıkları ile çevreye yayılmaktadır. Bakteri kurumaya dayanıklı olduğu için hayvan barınaklarındaki gübre ve toza karışarak aylarca canlı kalabilmektedir. *C.burnetii*, kontamine toz ve aerosollerin solunum yolu ile alınması ile insanlara bulaşmakta ve enfeksiyon oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca keneler de *C.burnetii*'nin vektörü konumdadır. Keneler kan emmeleri sırasında veya dışkıları ile etkeni bulaştırır ve yayarlar<sup>7,8</sup>.

Q ateşinin tanısında seroloji, moleküler ve kültürel yöntemler kullanılmaktadır. Serolojide altın standart test olarak indirekt floresan antikor testi (IFAT) uygulanmaktadır. Kompleman fiksasyon ve "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" testleri de tanıda kullanılmaktadır. Moleküler testlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile klinik örneklerde *C.burnetii* DNA'sı belirlenebilmektedir. Hücre kültürlerine veya embriyonlu tavuk yumurtalarına ekimler yapılarak etken üretilmektedir. *C.burnetii*'nin üretilmesi için sıvı ve katı kültür ortamı sağlayan ACCM besiyerinde geliştirilmiştir<sup>9</sup>.

Bu çalışmada, ülkemizde ilk defa endokarditli bir hastanın kalp kapakçığı dokusundan hücre kültürü yöntemiyle *C.burnetii* izolasyonu, moleküler, serolojik yöntemlerle izolatin tanımlanması, elde edilen izolattan faz I IFAT antijeni hazırlanması ve faz değişimi çalışması sunulması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Kardiyopulmoner egzersiz dispnesi ve subfebril ateş nedeniyle 35 yaşındaki erkek hasta enfeksiyon hastalıkları kliniğine başvurmuştur. Yapılan muayene ve tetkiklerde biküspit aort kapak, hafif-orta aort stenozu ve hafif-orta regürjitasyonu gözlenmiştir. Transtorasik ve transözofageal ekokardiyografide (TTE) aort küspisi üzerinde bir vejetasyon belirlenmiştir. Yüksek doz diüretik ve nitrogliserin tedavisine karşın hastada kalp yetmezliği gelişmesi sonucunda acil olarak aort kapak replasmanı ameliyatı yapılmıştır<sup>10</sup>. Klinik olarak enfektif endokardit düşünülen ve serolojik olarak *C.burnetii* faz I IgG 1/32.768 titrede pozitif bulunarak kronik Q ateşi endokarditi tanısı konulan hastanın, kalp kapak replasmanı ameliyatı sırasında çıkarılmış olan kalp kapakçığı dokusu laboratuvarımıza gönderildi. Kalp kapakçığı dokusu aşağıda açıklanan işlemler sonunda hücre kültürü yapılmak üzere işleme alındı.

### Doku Homojenizasyonu, DNA Ekstraksiyonu ve Gerçek Zamanlı PCR

Bir parça kalp kapakçığı dokusu, beyin kalp infüzyon buyyonu içine alınarak Magnalyser homojenizasyon cihazında (Roche, Rotkreuz, İsviçre) homojenize edildi. Homojenizasyondan 100 µl alınarak doku ekstraksiyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

*C.burnetii* ompA gen bölgesini belirlemede Jatón ve arkadaşlarının<sup>11</sup> 2013 yılında bildirdiği COX primerleri, probu ve protokolü kullanılarak Rt-PCR çalışıldı. PCR, LightCycler probe master miks (Roche, Mannheim Almanya) kullanılarak, LightCycler96 (Roche, Mannheim Almanya) Rt-PCR cihazında uygulandı.

### Hücre Kültürü

Gouriet ve arkadaşlarının<sup>12</sup> önerdiği hücre kültürü protokolü aşağıda tarif edildiği gibi uygulanarak PCR pozitif kalp kapakçığı dokusu örneği hücre kültürüne alındı. Vero (ATCC CCL-81) hücreleri antibiyotikli (penisilin, streptomisin) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ve %5 fetal sıgır serum (FBS) içeren viallere pasajlandı ve monolayer hücre oluşturmaları sağlandı. Monolayer hücre oluşturulan viallere *C.burnetii* PCR pozitif kalp kapakçığı dokusu homojenizatından 100 µl inoküle edildi. İnokülumdaki bakterileri monolayer oluşturmuş hücrelere yaklaştırmak için hücre vialleri 1 saat 700x g'de santrifüj edildi. Bir gün 36°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Birinci günde kültür vasatı %5 FBS içeren antibiyotiksiz DMEM ile değiştirildi ve bir hafta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra enfekte hücreler kazanarak toplandı ve iyice süspanse edildi. Enfekte hücre süspanسیونundan 10 µl alınarak IFAT lamalarına kaplandı, kurutulduktan sonra asetona fikse edildi ve *C.burnetii* faz I immünglobulin G (IgG) pozitif serum (Vircell,

Granada, İspanya) kullanılarak IFAT ile hücrelerde üreme olup olmadığı kontrol edildi. Hücre süspansiyonundan DNA ekstraksiyonu yapıldı Rt-PCR çalışıldı.

### 16S Ribozomal RNA PCR ve DNA Dizi Analizi

İzolatımızdan elde edilen DNA'dan, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak *Coxiella* 16S ribozomal RNA bölgesi PCR'ı çalışıldı<sup>13</sup>. DNA dizi analizi için PCR amplifikasyon ürünlerini saflaştırma işlemi, "ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific, ABD)" ticari kiti ile firma önerilerine uygun şekilde gerçekleştirildi. ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme (Applied Biosystems, Foster City, CA) kiti kullanılarak çift yönlü nükleotid dizisi elde edildi. DNA dizi analizi verileri Basic Local Alignment Search Tool (Blast version 2.0) programı kullanılarak GenBank verileri ile karşılaştırıldı.

### Filogenetik Analiz ve Ağaç Oluşturulması

Filogenetik analiz ve ağaç oluşturulması amacıyla "Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5 (MEGA5)" programı kullanıldı. Filogenetik ağaç oluşturmak için maximum likelihood yöntemi, istatistiksel filogeni güvenilirliğini ortaya koymak için Bootstrap metod, Kimura 2 parameter model uygulandı.

### *Coxiella burnetii* IFAT Antijeni Hazırlanması ve Faz Değişimi Çalışması

IFAT antijeni hazırlamada Dupont ve arkadaşlarının<sup>14</sup> 1994'te bildirdiği yöntem bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Üreme gözlenen enfekte hücre süspansiyonundan 100 µl, tekrar Vero hücre kültürüne inoküle edilerek bakteri çoğaltıldı. Enfekte hücrelerin vasatı ayrıldıktan sonra üzerine PBS eklenerek hücre kazıyıcı ile kaldırıldı ve bir tüpe alındı. Enfekte hücreler, dondurma-çözdürme ve ultrasonik banyoda sonikasyonla parçalanarak *C.burnetii* bakteri süspansiyonu elde edildi. Bakteri süspansiyonunda hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için süspansiyon 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve bakteri içeren süpernatant ayrıldı. Bakteri içeren süpernatant üzerine formaldehit (%0.4) eklendi ve bir gün oda sıcaklığında bekletilerek inaktive edildi. *C.burnetii* bakteri süspansiyonu, dilüsyonları yapılırken yüksek devirde vortekslendi ve bakterilerin otoaglutinasyonunu engellemek için %1 yumurta sarısı eklendi. Her dilüsyondan lam godelerine 2 µl bakteri süspansiyonu bırakıldı, lamlar oda sıcaklığında kurutuldu ve ardından asetonla bakteriler lamlara fikse edilerek antijen kaplı lamlar elde edildi. IFAT, hazırlanan antijen kaplı lamlar ile Dupont ve arkadaşlarının<sup>14</sup> önerileri doğrultusunda çalışıldı. IFAT'da, mikroskopik alana tek tek düşmüş, homojen bakteri yoğunluğu gösteren dilüsyon *C.burnetii* faz I antijen olarak kullanıldı.

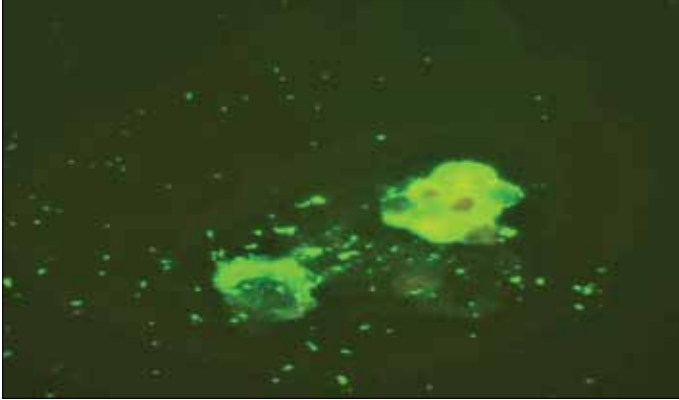
*C.burnetii* faz I antijenik varyantın *C.burnetii* faz II antijenik varyanta dönüşümünü gözlemek için izolat seri hücre kültürü pasajlarına alındı<sup>4</sup>. Her pasajdan sonra bakteri süspansiyonundan seri dilüsyonlar yapılarak IFAT lamlarına kaplama yapıldı. Her pasajdan sonra elde edilen antijen *C.burnetii* faz I ve faz II IgG pozitif serumlar (Vircell, Granada, İspanya) kullanılarak IFAT çalışılarak antijenik faz değişimi gözlenmeye çalışıldı.

Bu çalışmada klinik örneğin hücre kültürüne inokülasyonundan başlayan, hücre kültürü pasajları ve elde edilen antijenin inaktivasyon aşamasına kadar işlemler biyogüvenlik düzeyi 3 (BSL3) laboratuvarında gerçekleştirildi.

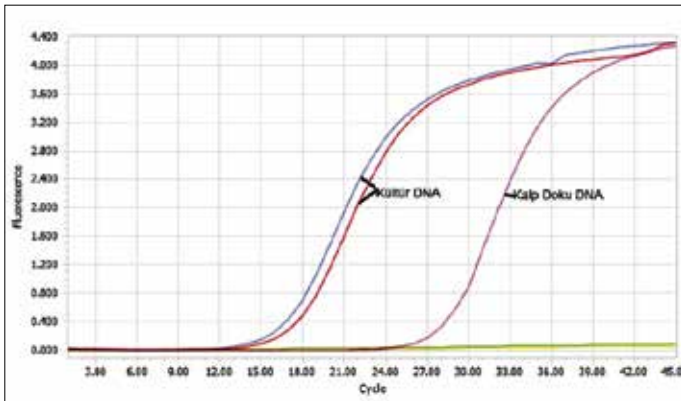
## BULGULAR

Kronik Q ateşi endokarditi tanısı konulan hastanın, kalp kapak replasmanı ameliyatı sırasında çıkarılmış olan ve homojenize edilen kalp kapakçığından elde edilen DNA, Rt-PCR'de *C.burnetii* yönünden pozitif bulunmuştur. Homojenize dokunun Vero hücre kültürüne inokülasyondan 7 gün sonra mekanik olarak kaldırılan hücreler IFAT lamalarına kaplandıktan sonra *C.burnetii* faz I IgG pozitif serum kullanılan IFAT'ta, yoğun bakteri ile enfekte Vero hücreleri gözlenmiştir (Resim 1).

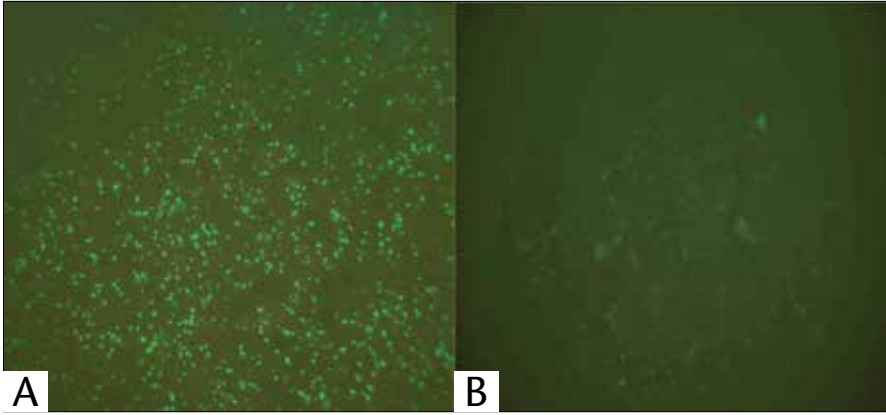
Enfekte hücrelerden elde edilen DNA ile tekrar Rt-PCR çalışıldığında, kalp doku örneğine göre 12 siklus önce pozitiflik belirlenmiştir. PCR ct değerine göre, kültür materyalindeki DNA miktarının artışıyla da üreme doğrulanmıştır (Şekil 1).



Resim 1. Vero hücre kültüründe üremiş *Coxiella burnetii*'nin IFAT'ta görüntüsü.



Şekil 1. Kalp doku örneğinin ve kültür örneğinin, Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR)'nda ct değerlerinin karşılaştırılması ile DNA artışının gösterilmesi.



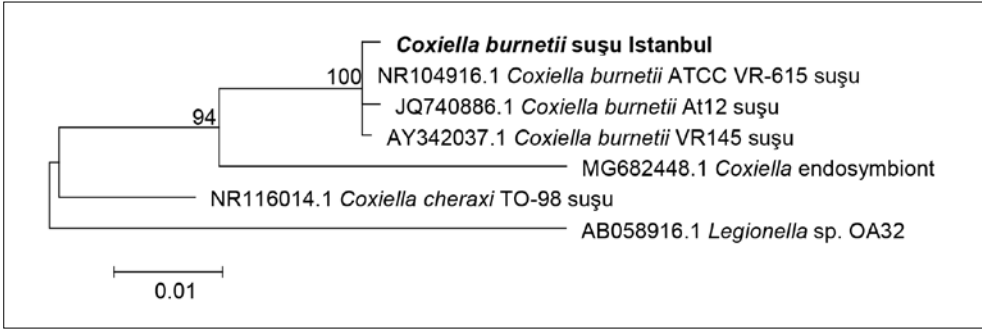
**Resim 2.** İzole edilen suştan hazırlanmış antijen ile IFAT'ta; *Coxiella burnetii* faz I immünglobulin G (IgG) pozitif (A), *C. burnetii* faz II IgG negatif (B) görüntüsü.

İkinci pasaj yapılarak bir hafta sonra elde edilen enfekte hücre süspansiyonu  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulup çözündürme ve sonikasyon yapılarak enfekte Vero hücreleri parçalanmış ve bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyon seyreltilerek *C. burnetii* IFAT antijeni hazırlanmıştır. *C. burnetii* faz I ve faz II IgG pozitif serumla yapılan çalışmada *C. burnetii* faz I IgG pozitif, faz II IgG negatif olarak belirlenmiştir (Resim 2). İzolatın *C. burnetii* faz I antijenik varyant karakterinde olduğu gözlenmiştir.

Bakteri süspansiyonundan elde edilen DNA ile 16S ribozomal RNA bölgesi PCR'ı çalışılmıştır. 27F ve 1492R primerlerinin kullanıldığı PCR'de elde edilen amplifikasyon ürünlerinin çift yönlü DNA dizi analizinde 1320 baz çifti (bp) büyüklüğünde nükleotit dizisi elde edilmiştir. Elde edilen nükleotit dizisinin GenBank verileri ile karşılaştırıldığında erişim numarası NR104916 olan *Coxiella burnetii* ATCC VR-615 suşu ile %99 benzer bulunmuş ve iki nükleotit farklılığı (566. baz pozisyonunda G-T ve 914. baz pozisyonunda C-T) gözlenmiştir.

Filogenetik analizde, izolatlarımızın 16S ribozomal RNA bölgesi dizisi ve Genbank kayıtlı tanımlanmış izolata ait dizi analizi verileri de kullanılarak, Mega5 programında maksimum likelihood yöntemi ile oluşturulan filogenetik ağaçta, filogeni güvenilirlik değerini gösteren bootstraps değeri %100 bulunmuştur (Şekil 2). İzolatımızın, filogenetik analize göre de *C. burnetii* olduğu ortaya konulmuştur.

*C. burnetii* faz I izolatu, faz II varyantına dönüştürmek için seri hücre kültürü pasajları yapılmış ve her pasaj sonrasında hazırlanan antijen ile *C. burnetii* faz I ve faz II IgG pozitif serumla IFAT çalışılmıştır. Seri pasajlar 17. pasaja kadar devam ettirilmiş her pasaj sonunda *C. burnetii* faz I IgG reaksiyon pozitif, faz II IgG reaksiyon negatif belirlenmiştir. İzolatımızda 17 pasaj sonunda faz II değişimi gözlenmemiştir.



Şekil 2. Kalp kapakçığı dokusundan izole edilen *Coxiella burnetii* suşunun 16S ribozomal RNA bölgesinin 1320 bp büyüklüğündeki dizi analizi ve GenBank'ta kayıtlı diğer *Coxiella burnetii* verileriyle MEGA5 programında Maximum Likelihood yöntemi ve Bootstrap yöntemi, Kimura 2 parameter model ile oluşturulan filogenetik ağacı.

## TARTIŞMA

Ülkemizde Q ateşine yönelik ilk çalışma Sabahattin Payzın ve Sait Bilal Golem tarafından 1948 yılında yapılmıştır<sup>15</sup>. Bu çalışmada ülkemizdeki akut Q ateşi olguları incelenmiş ve hasta kan ve serumlarının deney hayvanına inokülasyonu ile *C. burnetii* izolasyonu bildirilmiştir. Sonraki yıllarda, insanlarda ve hayvanlarda birçok seroepidemiyojik çalışma yapılmış *C. burnetii*'nin ülkemizde yaygın olduğu ortaya konulmuştur<sup>1</sup>. Son yıllarda moleküler çalışmaların laboratuvar kullanımına daha çok girmesi ile hayvanlarda ve insanlarda *C. burnetii* PCR pozitifliği görülmektedir<sup>16-19</sup>. Payzın ve arkadaşlarının izolasyon çalışmalarından<sup>15</sup> sonraki 70 yıllık süreç içerisinde *C. burnetii*'nin insanlardan izolasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu çalışmada ülkemizde ilk defa enfektif endokardit tanısı konan bir hastanın kalp kapakçığından hücre kültürü yöntemi ile *C. burnetii* izolasyonu yapılmıştır. İzolat 16S ribozomal RNA bölgesinin DNA dizi analizi ve *C. burnetii* faz I ve faz II IgG pozitif serum kullanarak IFAT ile tanımlanmıştır.

Shell vial hücre kültür yöntemi, geç ve güç üretilen hücre içi bakterilerin izolasyonunda kullanılan bir yöntemdir<sup>12</sup>. Ülkemizde bu yöntem kullanılarak *C. burnetii* izolasyonuna yönelik bir bildirimle rastlanamamıştır. Enfektif endokardit etkenlerinden geç ve güç üretilen bakteriler olan *C. burnetii* ve *Bartonella* spp. otomatize kan kültürü sistemlerinde üretilmemektedir. Kan kültürü negatif enfektif endokardit olgularında etken olabildiği bilinen *C. burnetii*'nin, bu hastalarda esas olarak serolojik yöntemlerle (*Coxiella* faz I IgG) araştırılması önerilmekle birlikte, shell vial hücre kültürü yöntemi de özellikle referans laboratuvarlarda bu bakterinin üretilmesi için kullanılabilir bir yöntemdir.

İnsanlarda akut Q ateşinde en sık rastlanan klinik tablolar grip benzeri hastalık, atipik pnömoni ve hepatittir. Olguların bir kısmı asemptomatik seyrederken, %90'ında sınırlı düzeyde ateş, baş ağrısı (%51), kas ağrısı (%37), eklem ağrısı (%27) ve öksürük (%34) gözlenmektedir<sup>20</sup>. En sık görülen bulgular ateş, pulmoner belirtiler ve yüksek karaciğer enzim seviyesidir. Atipik pnömoni en çok görülen klinik tablodur. Dermatolojik lezyonlar genelde düşünülen daha yaygındır, geçici döküntüler, makülopapüler lezyonlar ve daha nadiren eritema nodosum gözlenmektedir<sup>8</sup>. Akut Q ateşi olgularının %2'si kronik forma



dönüşür, kronik Q ateşinin en yaygın görülen klinik formu enfektif endokardittir<sup>21</sup>. Kronik Q ateşi klinik tablosu primer enfeksiyondan aylar sonra ortaya çıkabilmektedir. Kronik Q ateşi riski taşıyan kişiler genellikle kalp kapakçığı patolojisi veya vasküler greftleri olan, immün sistemi baskılanmış hastalar ile hamile kadınlar olarak bildirilmektedir<sup>3</sup>. Kan kültürü negatif endokarditli 348 olgunun %48'inin *C.burnetii* ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu hastaların %91'inde kalp kapakçığı problemi, %32'sinde immün sistem baskılanması bilgisi elde edilmiştir<sup>22</sup>. Ülkemizde *C.burnetii*'nin neden olduğu kronik endokardit olgusu ilk defa Şimşek-Yavuz ve arkadaşları<sup>19</sup> tarafından 2016 yılında bildirilmiştir. Laboratuvarımızda, son beş yılda serolojik ve moleküler yöntemlerle, *C.burnetii*'nin neden olduğu, bu olgu dahil dört endokardit olgusu belirlenmiştir (yayınlanmamış veri). Kültür negatif enfektif endokardit olgularında *C.burnetii*'nin etiyolojik etken olabileceği dikkate alınmalı ve serolojik, moleküler ve kültür yöntemleri kullanılarak kronik Q ateşi tanısı saf dışı bırakılmalıdır.

Ülkemizde Q ateşi tanısında serolojik yöntemler en çok kullanılan tanı yöntemidir<sup>1</sup>. Serolojide IFAT altın standart olarak kabul edilmektedir. Q ateşinin serolojik tanısında *C.burnetii*'nin iki antijenik yapısına karşı oluşan antikorların varlığına bakılmaktadır. *C.burnetii* faz I antikorlarının oluşmasından sorumlu antijenik yapı LPS-O antijeni iken *C.burnetii* faz II antikorlarının oluşmasında ise hücre duvarı yapısındaki proteinlerdir. Hücre duvarı protein yapıları daha iyi antijenik karakterde olduğu için daha erken humoral yanıt oluşturmakta, buna karşın LPS yapılarına yönelik humoral yanıt daha geç oluşmaktadır<sup>3</sup>. Akut Q ateşi tanısında *C.burnetii* faz II IgM ve IgG antikorlarına, kronik Q ateşi tanısında *C.burnetii* faz I ve faz II IgG antikor varlığına bakılmaktadır. Faz I IgG antikor titresinin 1/800 titrede veya üzeri olması kronik enfeksiyon göstergesi olarak değerlendirilirken yeni revizyon ile bu titrenin 1/1600 titre veya üzeri olması önerilmektedir. Bununla birlikte faz I IgG titresinin faz II IgG titresi kadar veya üzerinde olması beklenmektedir<sup>23,24</sup>. Bu çalışmada, Q ateşinin serolojik tanısında altın standart test olan IFAT'ta kullanılmak üzere antijen hazırlanmıştır. Elde edilen izolat faz I antijenik özelliğe sahip olduğu için bu izolattan hazırlanan antijen kronik Q ateşi tanısında kullanılabilir. Ülkemizde Q ateşi tanısında kullanılan kit ve bu kitlerin antijeni yurt dışından temin edilmektedir. Elde edilen izolat ve antijen sayesinde, Q ateşinin tanısında kullanılacak kitlerin hazırlanması ve geliştirilmesi için çalışacak araştırmacılar için yerel bir kaynak oluşturulduğu düşünülmektedir.

*C.burnetii* faz I varyantı seri hücre kültürü ve embriyolu tavuk yumurtasına pasajlar sonucunda bakteri genomundaki delesyona bağlı hücre duvarındaki LPS-O spesifik zincirinde bulunan virenoz ve dihidrohidroksistreptoz şeker moleküllerini kaybeder ve faz II avirülan forma dönüşür<sup>5</sup>. *C.burnetii* faz II avirülan varyant, faz I antijenlerini barındırmadığı için, akut olgularda ilk oluşan faz II antikorlarını belirlemede antijen olarak kullanılması açısından önemlidir. Kronik endokardit olgusundan izole ettiğimiz virülan *C.burnetii* faz I suşunu seri hücre kültürü pasajları ile *C.burnetii* faz II yapısına dönüştürüp faz II antijeni elde edebilmek için izolatımızı seri 17 hücre kültürü pasajı yapılmıştır fakat faz II antijenik varyanta dönüşümü serolojik olarak gözlenememiştir. Ftacek ve arkadaşları embriyolu tavuk yumurtasına pasajla bu dönüşümün gözlenmesi için 90 pasaj gerektiğini bildirmektedir<sup>25</sup>. Hotto ve arkadaşları<sup>26</sup> hücre kültürü pasajları ile bazı suşların 15 pasajla faz değişimini gösterdiğini, bazı suşların ise seri pasajlar sonrasında bu değişimi göstermediğini gözlemişlerdir.

Bundan sonraki çalışmalarda yerel suş, embriyolu tavuk yumurtasına veya hücre kültürlerine daha fazla pasajlar yapılarak *C.burnetii* faz II varyantına dönüştürülüp, faz II antijeni elde edilmesi ülkemiz için gerekli olan antijen üretimi için faydalı olacaktır.

*C.burnetii* çevresel koşullara dayanıklıdır ve uzun süre toz, gübre gibi hayvansal atıklar içerisinde canlılığını sürdürebilmektedir<sup>7</sup>. Morfolojik olarak küçük bir bakteri olması nedeni ile kolay aerosolize olarak insanları enfekte edebilir ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. İnsanlar için enfektif doz 1-10 bakteri olarak bildirilmektedir<sup>27,28</sup>. Bakteri ayrıca biyoterör ajanı olarak da değerlendirilmektedir<sup>1</sup>. *C.burnetii* bu özelliklerinden dolayı halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Laboratuvar tanısında kültür işlemleri BSL3 laboratuvarlarında yapılmalıdır. Ülkemizde, Payzın ve arkadaşlarının ilk izolasyon çalışmalarının sonrasında laboratuvar kaynaklı Q ateşi olguları da bildirilmiştir<sup>29</sup>. Ayrıca birçok ülkede laboratuvar kaynaklı Q ateşi olgularının bildirimini yapılmıştır<sup>30</sup>. *C.burnetii* izolasyonu ve canlı bakterinin kullanıldığı çalışmalarda araştırmacılar laboratuvar kaynaklı enfeksiyon riskini göz önünde bulundurmalı ve risk değerlendirmesi yaparak riski minimize etmelidir.

Payzın ve arkadaşlarının izolasyon çalışmasında<sup>31</sup> İstanbul, Ankara, İzmir ve Aksaray izolatları elde edilmiş ve bu izolatlar daha sonraki serolojik çalışmalarda antijen olarak kullanılmıştır. Bu izolatlar, muhtemelen saklama koşullarının yeterli olmaması nedeniyle günümüze kadar ulusal kültür koleksiyonlarında saklanıp korunamamıştır. Bu izolatlardan biri Amerika Birleşik Devletleri'nde bir kültür koleksiyonunda bulunmaktadır. Bu çalışmada hücre kültüründe üretilen, serolojik ve moleküler yöntemle tanımlanan *C.burnetii* faz I izolatu araştırmacıların kullanımına sunulmak üzere Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Kültür Koleksiyonuna teslim edilmiştir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Kılıç S, Çelebi B. Türkiye'de *C.burnetii*'nin epidemiyolojisi. Turk Hij Den Biyol Derg 2008;65(3):1-31.
2. McCaul TF, Williams JC. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. J Bacteriol 1981;147(3):1063-76.
3. Toman R, Heinzen RA, Samuel JE, Mege JL (Eds.) *Coxiella burnetii*: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium. 2012 1<sup>st</sup> ed Springer Dordrecht Heidelberg New York London.
4. Toman R, Skultéty L. Structural study on a lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* strain Nine Mile in avirulent phase II. Carbohydr Res 1996;22(283):175-85.
5. Toman R, Skultety L, Ihnatko R. *Coxiella burnetii* glycomics and proteomics tools for linking structure to function. Ann N Y Acad Sci 2009;1166:67-78.
6. Hackstadt T. Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide. Infect Immun 1988;56(4):802-7.
7. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis 2004;10(7):1264-9.
8. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis 2005;5(4):219-26.

9. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. Clin Microbiol Rev 2017;30(1):115-90.
10. Sonsöz MR, Bali EA, Aydoğan M, Mercanoglu F, Yavuz SŞ. Q ateşi endokarditi: Her zaman subakut veya kronik seyirli midir? Turk Kardiyol Dern Ars doi: 10.5543/TKDA.2019.59153.
11. Jatou K, Peter O, Raoult D, Tissot J-D, Greub G. Development of a high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. New Microbes New Infect 2013;1:6-12.
12. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. J Clin Microbiol 2005;43(10):4993-5002.
13. Miller CS, Handley KM, Wrighton KC, Frischkorn KR, Thomas BC, Banfield AF. Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. PLoS One 2013;8(2):e56018.
14. Dupont HT, Thirion X, Raoult D. Q fever serology cut off determination for microimmunofluorescence. Clin Diagn Lab Immunol 1994;1(2):189-96.
15. Payzın S, Golem SB. Türkiye'de Q humması. Türk İji Tec Biyol Der 1948;8(1):94-113.
16. Kırkan S, Kaya O, Tekbıyık S, Parın U. Detection of *Coxiella burnetii* in Cattle by PCR. Turk J Vet Anim Sci 2008;32(3):215-20.
17. Küçükkalem ÖF, Cengiz S, Altun SK, Yıldırım M. Erzurum ilinde sığır abortlarında *Coxiella burnetii*'nin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg 2013;8(3):224-8.
18. Günaydin E, Müştak HK, Sareyyüpoğlu B, Ata Z. PCR detection of *Coxiella burnetii* in fetal abomasal contents of ruminants. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2015;21(1):69-73.
19. Yavuz SS, Özbek E, Başaran S, Çelebi B, Yılmaz E, Başaran M, et al. The first case of chronic Q fever endocarditis and aortitis from Turkey: A 5-year infection before diagnosis with drain in sternum. Anatol J Cardiol 2016;16(10):814-6.
20. Tissot-Dupont H, Raoult D. Q fever. Infect Dis Clin North Am 2008;22(3):505-14.
21. Angelakis E, Raoult D. Q fever. Vet Microbiol 2010;140(3-4):297-309.
22. Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. Medicine 2005;84(3):162-73.
23. Fournier PE, Casalta JP, Habib G, Messana T, Raoult D. Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke Endocarditis Service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. Am J Med 1996;100(6):629-33.
24. Frankel D, Richet H, Renvoisé A, Raoult D. Q fever in France, 1985-2009. Emerg Infect Dis 2011;17(3):350-6.
25. Ftáček P, Skultéty L, Toman R. Phase variation of *Coxiella burnetii* strain Priscilla: influence of this phenomenon on biochemical features of its lipopolysaccharide. J Endotoxin Res 2000;6(5):369-76.
26. Hotta A, Kawamura M, To H, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies. Infect Immun 2002;70(8):4747-9.
27. Jones RM, Nicas M, Hubbard AE, Reingold E. The infectious dose of *Coxiella burnetii* (Q Fever). Appl Biosaf 2006;11(1):32-4.
28. Brooke RJ, Kretschmar ME, Mutters NT, Teunis PF. Human dose response relation for airborne exposure to *Coxiella burnetii*. BMC Infect Dis 2013;21(13):488.
29. Onul B, Uysalefe D. Q hummasının deri testleri vasıtasıyla teşhisi. Türk İji Tec Biyol Der 1952;12(3):185-91.
30. Johnson JE, Kadull PJ. Laboratory-acquired Q fever. A report of fifty cases. Am J Med 1966;41(3):391-403.
31. Payzın S. Türkiyede Q humması Epidemiyolojisi. Türk İji Tec Biyol Der 1949;9(2):101-10.