



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.  
2010: 24 (3): 129 - 132  
http://www.fusabil.org

### Atık Sığır Fetüslerinde *Chlamydomphila abortus*' un Mikrobiyolojik Kültür ve PZR ile Saptanması

Ayşe KILIÇ<sup>1</sup>  
Hakan KALENDER<sup>2</sup>  
Adile MUZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Sivrice  
Meslek Yüksek Okulu,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi,  
Süleyman Demirel Keban  
Meslek Yüksek Okulu,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 19.04.2010  
Kabul Tarihi : 05.07.2010

#### Yazışma Adresi Correspondence

Ayşe KILIÇ  
Fırat Üniversitesi,  
Sivrice Meslek Yüksek  
Okulu  
Elazığ - TÜRKİYE

akilic23@gmail.com

Bu çalışmada abort yapan 47 sığira ait fetusun doku örnekleri *Chlamydomphila abortus* yönünden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve mikrobiyolojik kültür yöntemleriyle incelendi. 47 fetusun 3'ünde *C.abortus* DNA'sı saptandı. PZR pozitif örneklerin tümü kültür pozitifti.

**Anahtar kelimeler:** *Chlamydomphila abortus*, sığır fetusu, PZR, kültür.

#### The Detection of *Chlamydomphila abortus* from Aborted Bovine Fetuses Using PCR and Microbiological Culture

In the present study, tissue samples from 47 aborted bovine fetuses were analysed to detect the presence of *Chlamydomphila abortus* by polymerase chain reaction and microbiological culture. *Chlamydomphila abortus* DNA was detected in 3 of 47 aborted bovine fetuses by PCR. All of PCR positive samples were culture positive.

**Keywords:** *Chlamydomphila abortus*, bovine fetus, PCR, culture.

#### Giriş

Chlamydiales kuşlar, memeliler ve insanlarda çeşitli hastalıklara neden olan zorunlu, hücre içi mikroorganizmalardır. Son yıllarda yapılan sınıflandırmada, Chlamydiaceae familyası içerisinde Chlamydia ve Chlamydomphila olmak üzere iki cins yer almaktadır. Chlamydomphila cinsinde yer alan *Chlamydomphila abortus* (*C.abortus*) ve *Chlamydomphila pecorum* (*C.pecorum*) türleri ruminantlarda hastalığa neden olur (1). Sığırlarda chlamydial enfeksiyon abort, endometritis, vaginitis gibi reproduktif bozukluklar meydana getirir (2, 3).

Abort yapan hayvanlarda enfeksiyöz elementer cisimcikler süt, dışkı, nasal ve oküler akıntılarla etrafa bulaşır. *C.abortus* aynı zamanda infertiliteye ya da embriyonik ölüme yol açmasının yanı sıra semen ile de nakledilir (4, 5). Ayrıca yabancı hayvanlar da bu organizmanın rezervuarı olarak hastalığın yayılmasına ve çevrenin kontaminasyonuna yol açar (6, 7). Gebe olmayan hayvanlarda organizma gebeliğin başlangıcına kadar lenfoid dokuda latent formda bulunur Ancak abort oluncaya kadar enfeksiyon serolojik olarak yada patojenin direk tespiti yoluyla teşhis edilemez (8, 9).

*C abortus* doku kültürü, embriyolu tavuk yumurtası ve laboratuvar hayvanlarında üretilebilmektedir. Plasenta, fetal organlar, vaginal akıntı ve semen gibi biyolojik örneklerde *C.abortus*'u tanımlama için farklı teşhis yöntemleri kullanılabilir. Bu yöntemler embriyolu tavuk yumurtası, McCoy, VERO, ve L929gibi sürekli hücre kültürü, protein tespiti (direk immunofluorescence, immunhistokimya ve ELISA ) ve nükleik asit tespiti (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi teknikleri kapsar (10-13). İnfekte hayvanları tespit etmede en kolay metotlar; immunofloresan, ELISA ve komplement fikzasyon testleridir. Bu metotların spesifite ve sensitiviteyi farklı olmakla birlikte serolojik teşhiste komplement fikzasyon test yaygın olarak kullanılmaktadır (14-15). Son zamanlarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (PZR-RFLP) ve omp A gen sekanslama yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat bunların yapılması için emek, zaman ve özel laboratuvarlar gereklidir (16). PZR gibi moleküler yöntemlerin spesifite ve sensitiviteyi yüksektir (17, 18).

Bu çalışmada atık sığır fetüslerinde hayvan yetiştiriciliği sektöründe ekonomik olarak önemli olan Chlamydiales hastalığının teşhisinde kültüre alternatif olarak PZR metodunun kullanılması amaçlanmıştır.

#### Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini 2009-2010 yılları arasında Elazığ merkez ve köylerinden toplanan ve Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne getirilen toplam 47 adet atık sığır fetusu oluşturdu. Fetusun doku örnekleri (karaciğer, akciğer), kotiledonlar, plasental membranlar alınarak streptomycin (200 µg/ml) içeren nutrient broth içerisinde doku homojenatları hazırlandı.

Bu homojenattan 0,2 ml alınarak 6-8 günlük embriyolu yumurtaların sarı keselerine ekildi (19). Ekim yapılan yumurtalar 37°C'lik etüve bırakıldı. Ekimden sonra enfeksiyona bağlı olarak embriyolar 4. günden sonra ölmeye başladı (19). Ölen embriyoların yumurta sarıları alınarak DNA ekstraksiyonu için kullanıldı (20). Embriyo ölümlerin görülmediği durumda iki kez kör pasaj yapıldı. Etken identifikasyonu için embriyolu yumurtaların sarı kesesi zarlarından preparat hazırlanarak stamp boyama ile boyandı. Elementer cisimcikler görülen örneklerden elde edilen DNA'lar PZR ile tanımlandı.

**C. abortus DNA'sının PZR ile tespiti:** Embriyo ölümlerinin görüldüğü yumurtaların sarı keseleri DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Doku ekstraksiyon kitinde (QIAmp DNA mini Kit (Qiagen) belirtildiği şekilde DNA izole edildi. DNA ekstraksiyonu için yumurta sarı kesesi sıvısından 200 µl alınarak enzim solüsyonu içinde ( 20 mg lysozyme, 20 mM Tris-HCL (ph 8.0), 2mM EDTA ve 1.2 % Triton) 37°C' de 1 saat inkube edildi. Sonra 25 µl Proteinaz K ve 200 µl buffer AL (Qiagen) ilave edildi. Daha sonra ise ilk önce 56°C'de 30 dak ve 70°C'de 10 dak inkube edildi. DNA'ya 200 µl elution buffer ilave edilerek -20°C de donduruldu. Bu süspansiyondan 5 µl alınarak PZR'de hedef DNA olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak inokülasyon yapılmayan tavuk yumurtlarından ekstrakte edilen DNA'lar kullanıldı.

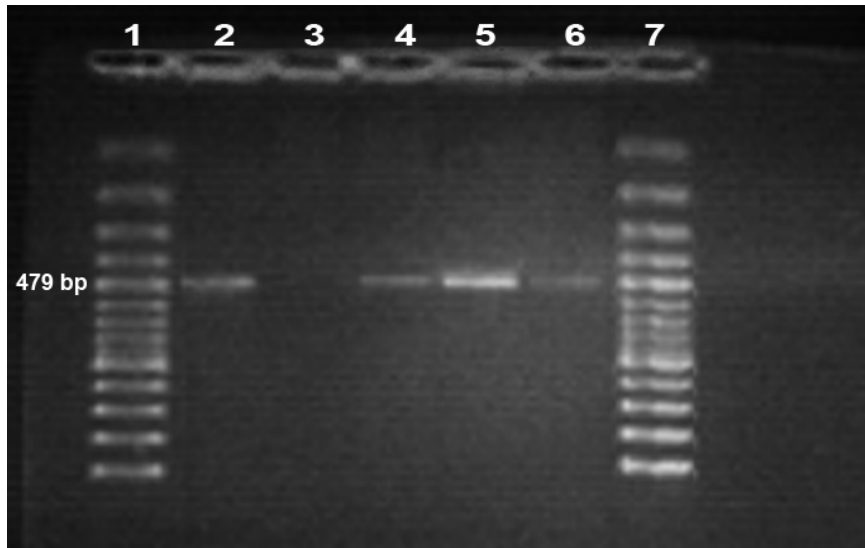
Toplam 50 µl'lik volümde hazırlanan PZR karışımı 5µl 10xPZR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, %1 Triton X-100), deoksitriksinükleotid trifosfatların her birinden 250 µM, 2U Taq DNA polimerase enzimi (Fermentas), 40 pmol her bir primer 8 FP: 5'-TGG TAT TCT TGC CGA TGA C-3'; RP: 5'-GAT

CGT AAC TGC TTA ATA AAC CG-3' (21) ve 5 µl hedef DNA içermektedir. PZR Reaksiyonu, Touchdown Thermocycler'de (Hybaid Marka, İngiltere) gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu 95°C'de 5 dakika ön ısıtmayı müteakip 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 45°C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72°C' de 2 dakika olmak üzere 40 siklus halinde gerçekleştirildi. Son siklus 72°C'de 7 dakika olarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon Perkin-Elmer Gene Amp PCR sistemi 2400 thermocycler'de yapıldı. Ampliconlar ise +4 °C'de elektroforeze kadar bekletildi.

PZR'de amplifiye edilen DNA, agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez tampon solüsyonu olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) kullanıldı ve bir midi jel elektroforez tankında 70 voltta 1 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforezi müteakip, jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı ve sonuçlar ultraviyole transilluminatörde değerlendirildi. PZR ürünlerinin jel elektroforezi neticesinde 479 bp uzunluğundaki bant *C. abortus* yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

### Bulgular

Toplam 47 adet atık sığır fetusunun incelenmesi sonucunda; embriyo ölümleri görülen 3 örneğe (% 6.3) ait yumurtaların sarı kesesi zarlarından yapılan boyamalarda elementer cisimcikler görüldü. Yumurtaların sarı keselerinden yapılan PZR testinde 479 bp uzunluğunda *C.abortus* DNA'sı saptandı (**Şekil 1**).



**Şekil 1. 1:** M:100 bp DNA ladder, **2:** *Chlamydophila abortus* pozitif kontrol, **3:** Negatif kontrol, **4, 5, 6:** Atık sığır fetuslarından elde edilen pozitif DNA örneklerinin PCR ürünleri, **7:** M:100 bp DNA ladder

## Tartışma

*C. abortus*' un lokal olarak plasental fonksiyonları etkileyerek abort ve perinatal ölümlere yola açtığı bilinmektedir (12). Bununla birlikte, *C. abortus* pozitif buzağılarda perinatal ölüm, ölü doğum ve abort oranlarının arttığı görülmekle birlikte, sığırlarda bu konudaki bilgiler azdır (22-23).

*C. abortus* prevalansının dünyada sığırlarda %5 ile %20 arasında olduğu bildirilmiştir (6, 8, 9). Wang (2001) abort yapmış ineklerde PZR ile *C. abortus*'u %34,9, PZR pozitif olan örneklerin daha sonra embriyolu tavuk yumurtasına yapmış olduğu ekimlerde %33,3, fetusta ise %8,3'lük bir oranda tespit etmiştir (24). Borel ve ark. (2006) intergenic spacer (IGS-S) PZR ile 235 vakanın 12'sinde pozitif (%5,1)' lik bulmuştur (25). Godin ve ark (2008) yaptıkları çalışmada reproduktif problemi olan 70 sürüde yapılan çalışmada 525 ineğin iki tanesini *C. abortus* yönünden seropozitif olarak bulmuş, seropozitif olanlar real time PZR 'a tabi tutulduğunda ise Chlamydiaceae 12 kontrol ineğin sadece 2 adet sıvabında bulunmuştur (26). Berri (2009) abort problemi olan ruminant sürülerinden alınan 67 kliniksel örneğin 16 (% 24)'sında (13 vajinal sıvab, 3 plasenta) *C. abortus*'u multiplex PZR ile pozitif bulmuştur (Berri, 2009) (27).

Sığırlarda *C. abortus*'un neden olduğu abortlar konusunda Türkiye'de yapılmış olan serolojik çalışmalar mevcut olmakla birlikte sınırlı düzeydedir. Gökçe ve ark. (2007) Kars yöresinde *C. abortus* yönünden abort yapmış sığırlardan alınan kan serumlarında ELISA ile % 8,33 (16/192) oranında pozitiflik saptamıştır (Gökçe, 2007) (28). Aynı araştırmacı sığırlarda *C. abortus* seroprevalansının % 4.76 ile 12.67 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bu çalışma Elazığ ve yöresinde abort yapmış

sığırlardan alınan doku örneği materyallerinde *C. abortus* varlığının PZR yöntemi ile araştırılmasına yönelik tek çalışmadır. Bu çalışma %6,3'lük oranda *C. abortus*'un neden olduğu sığır abort vakası olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz %6,3'lük pozitiflik oran yapılan diğer çalışmalarla paralel değerlerde bulunmuştur.

Chlamydia enfeksiyonlarının prevalansındaki artışın; sığırların bu enfeksiyona karşı antikor taşımaları, endometritis, fertilitate problemleri ve epizootik sığır abort hastalıklarının artması ile bağlantılı olduğu açıklanmıştır (24, 29-31). Rutin teşhiste PZR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması ile hastalığın tespit edilme oranı artmıştır (4,18). Chlamydia'da dıştaki zar proteini (MOMP gene), CTU ve CHOMP 371 primerleri ile çoğaltılırken, CPI ve PSI primerlerinin gendeki bölgelerin birisinden seçilmiş olduğu bildirilmiştir. Clone 8 primerleri MOMP primerlerinden daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan clone 8 primerleri ile başarılı bir şekilde hedef DNA 'nın izolasyonu yapılarak 479 bp'lik ürün elde edilmiştir (21). Bu durum chlamydia genomda helicase geninin birçok kopyasının olmasıyla açıklanmıştır.

Bu çalışmada toplam 47 kliniksel örneğin 3'ünde PZR ile *C. abortus* etkeni için pozitiflik elde edilmiş olup, bulunan %6,3 lik oran bu yörede *C. abortus*'un neden olduğu sığır enzootik abortusunun varlığını göstermekle birlikte, abort olayları ile mücadelede *C. abortus* üzerinde durulması, yine prevalans ve insidens saptanmasına yönelik olarak çalışmaların yapılmasında fayda görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada PZR ve kültür sonuçlarının aynı olması, PZR'nin kültüre paralel olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

## Kaynaklar

1. Everett KDE. Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. Vet Microbiol 2000; 75: 109-126.
2. Storz J. Overview of animal diseases induced by chlamydial infections. In Microbiology of Chlamydia Edited by: Barron AL, Florida: CRC Press Inc 1988; 167-192.
3. Wehrend A, Failing K, Hauser B, Jager C, Bostedt H. Production, reproductive, and metabolic factors associated with chlamydial seropositivity and reproductive tract antigens in dairy herds with fertility disorders. Theriogenology 2005; 63: 923-930.
4. Jee J, DeGraves FJ, Kim TY, Kaltenboeck B. High prevalence of natural Chlamydia species infection in calves. J Clin Microbiol 2004; 42: 5664-5672.
5. Ongor H, Cetinkaya B, Acik MN, Karahan M, Bulut H. Detection of *Chlamydia abortus* in ovine milk by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction. Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2004; 51: 43-45.
6. Berri M, Bernard F, Lecu A, Ollivet-Courtois F, Rodolakis A. Molecular characterizations and ovine livevaccine 1B evaluation toward a *Chlamydia abortus* strain isolated from springbok antelope abortion. Vet Microbiol 2004; 103: 231-240.
7. Hotzel H, Berndt A, Melzer F, Sachse K. Occurrence of Chlamydiaceae spp. in a wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Thuringia (Germany). Vet Microbiol 2004; 103: 121-126.
8. Da Silva FG, De Freitas JC, Muller EE. *Chlamydia abortus* in production animals. CiencRural 2006; 36: 342-348.
9. Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. J Comp Pathol 2002; 126: 79-94.
10. Storz J, Carroll EJ, Ball L, Faulkner LC. Isolation of a psittacosis agent (Chlamydia) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. Am J Vet Res 1968; 29: 549-555.
11. Dagnal GJR, Wilsmore AJ. A simple staining method for the identification of Chlamydial elementary bodies in the fetal membranes of sheep affected by the ovine enzootic abortion. Vet Microbiol 1990; 21: 233-239.
12. Buxton D, Barlow RM, Finlayson J, Anderson IE, Mackellar A. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. J Comp Pathol 1990; 102: 221-237.
13. Laroucau K, Souriau A, Rodolakis A. Improved sensitivity of PCR for Chlamydia using pmp genes. Vet Microbiol 2001; 82: 155-164.

14. Aitken ID. OIE Manual Vol II. (B/028) 12 nde Prony 75017 Paris, France 1990.
15. Aitken ID. Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th Edition, Paris, France: Office International des Epizooties, 2000b.
16. Sachse K, Grossman E. Chlamydial diseases of domestic animals-zoonotic potential of the agents and diagnostic issues. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 2002; 109: 142-148.
17. Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and faecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. Vet Microbiol 2000; 72: 285-293.
18. DeGraves FJ, Gao D, Hennen HR, Schlapp T, Kaltenboeck B. Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. J Clin Microbiol 2003a; 41: 1726-1729.
19. Moulder JW. Chlamydiaceae. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol. I, Krieg NR, Hold JG. (Editors). Baltimore: Williams and Wilkins, 1984: 729-739.
20. McClenaghan M, Herring AJ, Aitken ID. Comparison of *C. psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analyses. Infect Immun 1984; 45: 384-389.
21. Creelan JL, McCullough SJ. Evaluation of strain specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci*) for the detection of EAE by PCR. FEMS Microbiology Letters 2000.
22. Papp JR, Shewen PE. Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. Infect Immun 1996; 64: 1116-1125.
23. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. J Comp Pathol 2003; 128: 217-244.
24. Wang FI, Shieh H, Liao YK. Prevalence of *Chlamydia abortus* infection in domesticated ruminants in Taiwan. J Vet Med Sci 2001; 63: 1215-1220.
25. Borel N, Thoma R, Spaeni P. et al. Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. Vet Pathol 2006; 43: 702-708.
26. Godin AC, Björkman C, Englund S, Johansson K, Niskanen R, Alenius S. Investigation of *Chlamydia* spp. in dairy cows with reproductive disorders. Acta Veterinaria Scandinavica 2008.
27. Berri M, Rekiki A, Boumedine KS, Rodolakis A. Simultaneous differential detection of *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. BMC Microbiology, 2009; 9: 130.
28. Gökçe HI, Kaçar C, Genç O, Sözmen M. Seroprevalence of *Chlamydia abortus* in aborting ewes and dairy cattle in the north-east part of Turkey. Bull Vet Inst Pulawy 2007; 51: 9-13.
29. Cavirani S, Cabassi CS, Donofrio G, De Iaco B, Taddei S, Flammini CF. Association between *Chlamydia psittaci* seropositivity and abortion in Italian dairy cows. Prev Vet Med 2001; 50: 145-151.
30. Domeika M, Ganusauskas A, Bassiri M, Froman G, Mardh PA. Comparison of polymerase chain reaction, direct immunofluorescence, cell culture and enzyme immunoassay for the detection of *Chlamydia psittaci* in bull semen. Vet Microbiol 1994; 42: 273-280.
31. Wittenbrink MM, Horchler H, Bisping W. Investigations into the incidence of *Chlamydia psittaci* in the genital tract and feces of female cattle. J Vet Med B 1988; 35: 237-246.