



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Sığır abortlarında *Chlamydomphila abortus* varlığının PZR ile araştırılması

Zeki Aras^{1*}, Zafer Sayın², Gökçenur Sanioglu Gölen¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Campus, Aksaray, ²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Campus, Konya, Turkey
Geliş: 20.12.2016, Kabul: 06.01.2017
*zekiaras@hotmail.com (Z. Aras).

Öz

Aras Z, Sayın Z, Gölen GS. Sığır abortlarında *Chlamydomphila abortus* varlığının PZR ile araştırılması.

Abstract

Aras Z, Sayın Z, Gölen GS. Investigation of *Chlamydomphila abortus* in abortion of cattle by PCR.

Eurasian J Vet Sci, 2017, 33, 2, 77-80
DOI:10.15312/EurasianJVetSci.2017.140

Amaç: Bu çalışmada, Aksaray ve Konya illerinden Laboratuvarımıza sunulan aborte inek fetus mide içeriklerinde *Chlamydomphila abortus* (*C. abortus*) varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılması amaçlandı.

Aim: The purpose of this study was to investigate *Chlamydomphila abortus* in fetal abomasal contents of cattle from Aksaray and Konya provinces by Polymerase Chain Reaction (PCR).

Gereç ve Yöntem: Aksaray Üniversitesi ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakülteleri Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına çeşitli işletmelerden teşhis amacıyla getirilen 65 adet aborte inek fetus mide içeriği numune olarak toplandı. Örneklerde *C. abortus*'un varlığı PZR metodu kullanılarak araştırıldı.

Materials and Methods: A total of 65 fetal abomasal contents of cattle that were sent to Veterinary Diagnostic laboratories of Aksaray and Selçuk Universities from Aksaray and Konya provinces were used as sample. The occurrence of *Chlamydomphila abortus* was investigated by PCR methods.

Bulgular: Toplam 65 adet aborte inek fetus mide içeriğinin PZR ile yapılan muayenesi sonucunda, 2 (%3) inek fetusu *C. abortus* yönünden pozitif olarak bulundu. Örneklerin 63 (%97)'ünde ise etkene ait DNA'ya rastlanmadı ve negatif olarak değerlendirildi.

Results: A total of 65 fetal abomasal contents of cattle were examined by PCR. Two (3%) fetal samples were found to be positive for *C. abortus*. In 63 (97%) samples, DNA of *C. abortus* were not detected and accepted to be negative.

Öneri: Sonuç olarak, Aksaray ve Konya bölgesinde *C. abortus*'a bağlı sığır atık vakaları ortaya konuldu. Bölgedeki abort vakalarıyla mücadelede *C. abortus*'un da dikkate alınması faydalı olacaktır.

Conclusions: In this study, abortion cases due to *C. abortus* in cattle were showed in Aksaray, Konya region. In taken prevention, measures for bovine abortion cases in this region should be aware of *C. abortus* aetiology.

Anahtar kelimeler: *Chlamydomphila abortus*, aborte fetus, PZR

Keywords: *Chlamydomphila abortus*, aborted fetus, PCR

Giriş

Chlamydiosis etkenleri arasında yer alan *Chlamydia abortus* (*C. abortus*) plasentitis ve abortusla karakterize olan bulaşıcı, infeksiyöz ve zoonoz bir hastalığa sebep olur. Hastalık koyunların yanı sıra sığır, keçi, domuz ve insanlarda da abort yapabilmektedir (Arda ve ark 1997). Hastalık ilk defa 1950 yılında İngiltere’de görülmüş olup, uzun yıllar ticari aşısının kullanılmasına rağmen İngiltere’de koyun abortlarının en sık görülen sebeplerindendir (Rodolakis 2001).

Chlamydiaceae familyası içinde *Chlamydia* ile *Chlamydia* cinsleri bulunmaktadır. *C. abortus* ve *Chlamydia pecorum* türleri *Chlamydia* cinsi içerisinde yer almakta ve evcil hayvanlarda abortus, endometritis, plasentitis gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Everett 2000). *C. abortus*, virus benzeri hayat siklusuna sahip olan obligat hücre içi yaşayan bir mikroorganizmadır. Küçük, kokoid, Gram negatif, hareketsiz, sporsuz ve 0.2-1.5 mikrometre çaplarında olan etken zorunlu intrasellüler parazit olduğundan sadece canlı hücrelerde ürer. Cansız hücrelerde, sıvı veya katı besiyerlerinde üreyemez (Arda ve ark 1997). Enfekte hayvanların süt, dışkı, vaginal akıntıları ve abort materyali ile infektif elementer cisimcikler etrafa saçılır. Hastalık bu materyal ve akıntıların kontamine ettiği yemlerle bulaşmaktadır (Rodolakis 2001, Jee ve ark 2004).

Hastalığın teşhisi, atık materyallerinde, plasenta ve atık yapmış koyunların vaginal akıntılarında *C. abortus*’un direk mikroskopisi, embriyolu tavuk yumurtası ve hücre kültürlerinde izolasyonu, serolojik olarak kan serumunda anti-Chlamydia antikorların belirlenmesi ve *Chlamydia* DNA’nın PZR tekniğiyle belirlenmesi ile yapılabilmektedir (Rodolakis 2001).

Türkiye’nin değişik bölgelerinde *Chlamydia abortus*’un prevalansını belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Güler ve ark 2006, Gökçe ve ark 2007, Kılıç ve ark 2010, Kalender ve ark 2013). Fakat hastalığın yaygınlığını belirleyen bu çalışmalar sınırlı sayıda ve bölgesel olarak güncellenmeye ihtiyaç duyar durumdadır. Bu çalışmada, Aksaray ve Konya illerinde görülen inek atık vakalarından toplanan fetuslarda *C. abortus* varlığının PZR ile araştırılarak enfeksiyonun yaygınlığının ortaya konulması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Saha örnekleri

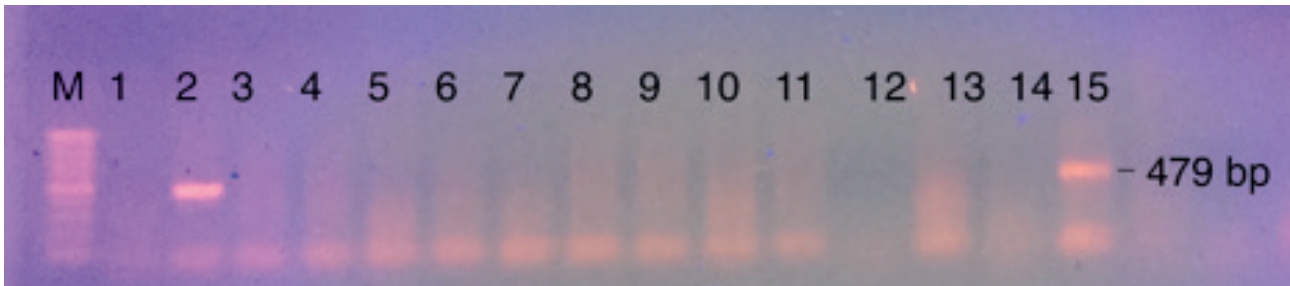
Çalışma amacıyla Konya ve Aksaray illerinde bulunan çeşitli sığırcılık işletmelerinden Aksaray Üniversitesi ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakülteleri Mikrobiyoloji AD laboratuvarlarına teşhis amacıyla getirilen toplam 65 adet aborte sığır fetus abomazum içeriği materyal olarak kullanıldı. Numuneler DNA ekstraksiyonuna tabi tutulana kadar -20°C’de saklandı.

DNA ekstraksiyonu

Toplanan örneklerden DNA ekstraksiyonu ThermoScientific Genomic DNA Purification Kiti (K0512) ile üretici firmanın belirttiği şekilde yapıldı. Fötal mide içerik örnekleri 7500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve üst kısım atılarak pelet 200 µL distile su içerisinde süspansiyon edildi. Daha sonra üzerine 400 µL lizis solüsyonu ilave edilip 65°C’de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüpe 600 µL kloroform ilave edilip bir kaç kez alt üst edildi ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Üstteki aköz kısım yeni bir tüpe alınıp üzerine 800 µL presipitasyon solüsyonu ilave edildi ve 1-2 dakika karıştırılıp 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldıktan sonra pelet 100 µL 1.2 M NaCl içerisinde süspansiyon edildi. Üzerine 300 µL soğuk etanol ilave edilip -20 °C’de 10 dakika tutulduktan sonra 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet %70 etanol ile bir kez daha yıkandı ve pelet 100 µL distile su içerisinde süspansiyon edilerek DNA elde edildi. Elde edilen DNA örnekleri kullanılmaya kadar -20°C’de saklandı.

PZR metodu

Örneklerde *C. abortus*’un araştırılması amacıyla da Crean ve Cullough (2000) un bildirdiği PZR metodu kullanıldı. Primer olarak 8FP (5’-TGG TAT TCT TGC CGA TGA-3’) ve RP (5’-GAT CGT AAC TGC TTA ATA AAC CG-3’) kullanıldı. PZR karışımı (10xPCR buffer, 25 mM MgCl₂ 5 µL, 250 µM dNTP, 2U Taq DNA polimerase enzimi, 1 µM primer ve 5 µL hedef DNA) 50 µL’lik miktarlarda hazırlandı. DNA amplifikasyonu ısı döngü cihazında (95°C’de 5 dakika 1 döngü; 94°C’de 1 dakika, 50°C’de 1 dakika ve 72°C’de 2 dakika 40 döngü; 72°C’de 7 dakika 1 döngü) gerçekleştirildikten sonra PZR ürünleri jel



Resim 1. PZR ile *C. abortus* spesifik bantların görüntülenmesi. M: Marker 100 bp (Vivantis), 2 ve 15: Pozitif mide içeriği örnekleri (479 bp), 1, 3-14: Negatif örnekler.



üzerinde görüntülendi ve 479 bp boyutundaki bantlar pozitif olarak değerlendirildi.

Bulgular

Aksaray ve Konya merkez ve ilçelerinden teşhis amacı ile Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarlarına getirilen toplam 65 adet aborte sığır fetus mide içeriğinin PZR ile yapılan muayene sonucunda, örneklerden 2 (%3)'si *C. abortus* yönünden pozitif olarak bulundu. Örneklerin 63 (%97)'ünde ise etkene ait DNA'ya rastlanmadı ve negatif olarak değerlendirildi (Resim 1).

Tartışma

Abortus dış ortamda yaşama şansı bulunmayan fetusun, gebelik süresi tamamlanmadan, çoğunlukla ölü, bazen de canlı olarak uterustan çıkarılması olarak tanımlanmaktadır. Daha spesifik olarak ise ineklerde gebeliğin 200, kısırakta 300, koyun ve keçi de 130, köpeklerde 55, kedilerde 45. gününden önce şekillenen doğumlar abortus olarak kabul edilmektedir (Hazıroğlu ve Milli 1998).

Enfeksiyöz abortlar, bakteriyel, viral, fungal ve protozoal etkenlere bağlı olarak meydana gelmektedirler. Genellikle sürü problemi olarak ortaya çıkmakta ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Anderson 2003). Abortlara en sık neden olan bakteriyel hastalıklar; Brusellozis, Kamfilobakteriyozis, Leptospirozis, Salmonellozis, Listeriozis, Klamidyozis ve Q Fever'dır (Kaya ve ark 1995).

Dünyanın değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda *C. abortus*'a bağlı abortların sığırlarda yaygınlığı %5 ile %34 arasında olduğu rapor edilmiştir (Wang 2001, Borel ve ark 2006, Chisu ve ark 2013). Chisu ve ark (2013) İtalya'da yaptıkları bir çalışmada, 49 aborte sığır materyalini *C. abortus* yönünden PZR ile incelemişler ve hastalığın prevalansını %6.1 olarak bulmuşlardır. Borel ve ark (2006), İsviçre'de 235 aborte sığır vakasını incelemişler ve *C. abortus*'un yaygınlığını %5 olarak bildirmişlerdir. Hastalığın aborte sığırlardaki prevalansı Tayvan'da da araştırılmış ve %34 olarak bulunmuştur.

Sığırlarda *C. abortus* kaynaklı abortların araştırılması ile ilgili, ülkemizde yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Gökçe ve ark (2007) yaptıkları serolojik bir çalışmada, Kars yöresindeki abort yapmış sığırlardan topladıkları kan serumlarını ELISA testi ile değerlendirmişler ve hastalığın seroprevalansını % 8.33 olarak bulmuşlardır. Kılıç ve ark (2010), Elazığ ilinden topladıkları 47 aborte sığır fetusu örneğini PZR ile incelemişler ve örneklerin % 6.3'ünün *C. abortus* yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Temur ve ark (2007), Erzurum yöresinden biriktirdikleri 90 aborte sığır fetusunu incelemişler ve % 5.5'inde *C. abortus* tespit etmiş-

lerdir. Bizim çalışmamızda da PZR ile incelenen 65 aborte sığır fetusunun % 3'ünde *C. abortus* etken olarak tespit edilmiştir. Bizim bulduğumuz pozitiflik oranının diğer çalışmalardan düşük olması bölgesel farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi ayrıca farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların örnekleme yapıldığı zamana yönelik veriler olarak değerlendirilmesi gereğinden de kaynaklanabilir.

Türkiye'deki koyun abortlarında *C. abortus*'un ne ölçüde sorumlu olduğunu belirlemek için, Kalender ve ark (2013) 71 koyun ve keçi aborte fetusunu kültür ve PZR yöntemleri ile incelemişler ve örneklerin 7 (%9.8)'sinin *C. abortus* pozitif olduğunu rapor etmişlerdir. Konya bölgesinde yapılan bir çalışmada, koyun atık vakalarının %7.5'inden *C. abortus*'un sorumlu olduğu PZR ile ortaya konulmuştur (Güler ve ark 2006). Bizim çalışmamızda, Konya ve Aksaray bölgelerinde görülen sığır atık vakalarının % 3'üne *C. abortus*'un sebep olduğu ortaya konuldu. Bu sonuç, Güler ve ark (2006)'nın aynı bölgede koyunlarda yaptığı çalışma sonucuyla karşılaştırıldığında enfeksiyonun bu bölgede koyunlara oranla sığırlarda daha düşük bir prevalansta seyrettiği anlaşılmaktadır.

Öneriler

Sonuç olarak, bu çalışmada toplam 65 örneğin % 3'ü *C. abortus* yönünden PZR ile pozitif olarak bulundu ve Aksaray - Konya bölgesinde *C. abortus*'a bağlı sığır atık vakaları ortaya konuldu. Bölgedeki abort vakalarıyla mücadelede *C. abortus*'un da dikkate alınmasının faydalı olacağı kanaatine varıldı.

Teşekkür

Bu proje Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: 2015-046) desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anderson M, 2003. Neospora Infection in Dairy Cattle, the Minnesota Dairy Health Conference, Mayıs 2003, Minnesota, USA.
- Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Leloğlu N, Kahraman M, Ilgaz A, Diker S, 1997. Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınevi, Ankara, pp: 110-124.
- Borel N, Thoma R, Spaeni P, 2006. Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. Vet Pathol, 43, 702-708.
- Chisu V, Porcu R, Tanda A, Masala G, 2013. First isolation and characterization of Chlamydia abortus from abortion tissues of sheep in Sardinia, Italy. Vet Italiana, 49, 331-334.
- Crealan J, Mc Cullough L, 2000. Evaluation of strain specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine Chlamydia abortus (*Chlamydia psittaci*) for the detection of EAE by PCR. FEMS Microbiol Lett, 190, 103-108.



- Everett KDE, 2000. Chlamydia and Chlamydiales: More than meets the eye. *Vet Microbiol*, 75, 109-126.
- Gökçe HI, Kaçar C, Genç O, Sözman M, 2007. Seroprevalance of Chlamydophila abortus in aborting ewes and dairy cattle in the north-east part of Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 9-13.
- Güler L, Hadimli HH, Erganiş O, Ateş M, Ok Ü, Gündüz K, 2006. Field evaluation of a PCR for the diagnosis of chlamydial abortion in sheep. *Vet Rec*, 159, 742-745.
- Hazıroğlu R, Milli ÜH, 1998. *Veteriner Patoloji, Cilt II*, Tamer Matbaacılık, Ankara, Türkiye, pp:433-538.
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC, 1992. A Coxiella burnetii repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol*, 174, 5540-5548.
- Jee J, DeGraves FJ, Kim TY, Kaltenboeck B, 2004. High prevalence of natural Chlamydophila species infection in calves. *J Clin Microbiol*, 42, 5664-5672.
- Kalender H, Kılıç A, Eröksüz H, Muz A, Kılınc Ü, Taşdemir B, 2013. Identification of of Chlamydophila abortus infection in aborting ewes and goats in Eastern Turkey. *Rev Med Vet*, 164, 295-301.
- Kılıç A, Kalender H, Muz A, 2010. Atık Sığır Fetuslarında Chlamydophila abortus' un Mikrobiyolojik Kültür ve PZR ile Saptanması. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 24, 129-132.
- Rodolakis A, 2001. Chlamydiosis in Goats, Recent Advances in Goat Diseases, International Veterinary Information Service, France.
- Temur A, Dinler U, Seyitoğlu Ş, Kılınc Ü, Yalçın E, 2007. Analysis of Chlamydial abortus of cattle reared in Erzurum and surrounding provinces through bacteriological, histopathologic methods. *Agris, FAO*, Erişim tarihi: 20.12.2016.
- Wang FI, Shieh H, Liao YK, 2001. Prevalence of Chlamydophila abortus infection in domesticated ruminants in Taiwan. *J Vet Med Sci*, 63, 1215-1220.

