

Sensitivitas dan Spesifisitas *Nested Polymerase Chain Reaction* untuk Mendeteksi DNA *Coxiella burnetii*

(SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF COXIELLA BURNETII DNA)

Trioso Purnawarman¹, I Wayan Teguh Wibawan²,
Fachriyan Hasmi Pasaribu², Agus Setiyono³, Muharam Saepulloh⁴

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, ²Bagian Mikrobiologi Medik, ³Bagian Patologi
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

Telepon:+62-251-8625588, Email: trioso18@yahoo.com

⁴Balai Besar Penelitian Veteriner, Cimanggu, Bogor

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian sensitivitas dan spesifisitas menggunakan *nested polymerase chain reaction* (*nested PCR*) untuk mendeteksi keberadaan DNA *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*). *Nested PCR* menggunakan primer eksternal (OMP1, OMP2) dan internal (OMP3, OMP4), didisain dari sekuen nukleotida gen *com 1* yang mengkode OMP 27 kD serta digunakan untuk mengamplifikasi fragmen sepanjang 501 pb dan 438 pb. *Nested PCR* mempunyai tingkat sensitivitas 50 kali lebih tinggi dibandingkan dengan *PCR* yang hanya menggunakan primer eksternal. Hasil uji sensitivitas didapat limit deteksi *nested PCR* menggunakan DNA murni mencapai 300 pg/μl. Berdasarkan uji spesifisitas, *nested PCR* hanya dapat mendeteksi DNA *C. burnetii* dan tidak terjadi hibridisasi silang dengan DNA *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Campylobacter Jejuni*. *Nested PCR* sudah digunakan sebagai metode diagnosis untuk penyakit *Q fever* yang disebabkan oleh *C. burnetii*.

Kata Kunci: *nested PCR*, *Coxiella burnetii*, sensitivitas dan spesifisitas

ABSTRACT

Sensitivity and specificity of nested polymerase chain reaction (*nested PCR*) to detect *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) DNA were studied. The primer system which consists of external primers (OMP1 and OMP2) and internal primers (OMP3 and OMP4), was designed from the nucleotide sequence of the *com I* gene encoding for 27 kDa outer membrane protein and used to specifically amplify a 501 bp and 438 bp fragment. This nested PCR assay was 50 fold more sensitive than that of using PCR external primer only. The Nested PCR has a detection limit as low as 300 pg/μl. Specificity studies showed that nested PCR only detected *C. burnetii* DNA and did not happened *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Campylobacter Jejuni* DNA. Nested PCR has high sensitively and specificaly diagnostic method of *C. burnetii* as agent of *Q fever* disease.

Key words: *nested PCR*, *Coxiella burnetii*, sensitivity and specificity

PENDAHULUAN

Query fever (*Q fever*) merupakan penyakit zoonosa yang sangat infeksius, menyebar luas hampir di seluruh dunia, menginfeksi orang yang berhubungan dengan pekerjaannya (*occupational hazard*) dan dapat ditularkan melalui makanan (*foodborne disease*) (Vaidya et al., 2008).

Penyakit ini disebabkan oleh *C. burnetii* yang bersifat obligat intraseluler, termasuk *bacteria like organism*, gram negatif dan berbentuk pleomorfik (bentuknya tidak tetap, batang atau kokoid), berukuran lebar 0,2-0,5 mikron dan panjang 0,4-1.0 mikron, mempunyai dua bentuk yaitu besar (*large form/large cell variant*) dan kecil (*small form/small cell variant*) yang diduga sebagai bentuk yang

infeksius (Fournier *et al.*, 1998; Heinzen *et al.*, 1999). *C. burnetii* memiliki dua bentuk antigen yakni antigen fase I dan fase II. Fase I ditemukan di alam atau hewan (patogenik), sedangkan fase II ditemukan setelah dibiakkan di telur tertunas atau sel kultur (kurang patogenik) (Angelakis dan Raoult 2010; Maurin dan Raoult 1999).

Agen penyebab tahan terhadap kondisi lingkungan panas, kering dan tahan terhadap beberapa disinfektan sehingga dapat bertahan hidup hingga 30 hari pada sputum kering, 120 hari pada debu, 49 hari pada urin marmut yang kering, 19 bulan pada feses caplak dan 12-16 bulan pada wol (CFSPH 2007).

Bakteri *C. burnetii* peka terhadap 0,05% hipoklorit, 5% peroksida, 1:100 larutan lisol, glutaraldehid, etanol, gas formaldehid, iradiasi dengan sinar gamma serta pemanasan susu pada suhu pasteurisasi lebih dari 62,7°C selama 30 menit atau 71,6°C selama 15 detik dan pasteurisasi telur pada suhu lebih dari 60°C selama 6,2 menit atau 61,1°C selama 3,5 menit (CFSPH 2007; Mine 2008).

Penularan dari hewan ke manusia terjadi melalui inhalasi *fomite* atau partikel debu (feses, urin dan wol), kontak langsung (plasenta dan sisa abortus) atau makanan (susu, daging, telur dan air) yang terkontaminasi 1-10 organisme (Acha dan Szyfres 2003; Angelakis dan Raoult 2010; CFSPH 2007). Sedangkan penularan dari manusia ke manusia dapat terjadi melalui transfusi darah dan kontak seksual (Milazzo, 2001).

Orang yang terserang penyakit *Q fever* umumnya menunjukkan gejala klinik yang *asymptomatic* (60%), *symptomatic* (38%) dan beberapa penyakit lainnya (2%), sehingga sulit dibedakan dengan gejala penyakit lain. Gejala akut umumnya seperti flu (*flue like syndrome*), misalnya demam, sakit kepala, berkeringat, menggigil, lemas (*fatigue*), pegal-pegal, sakit tenggorokan, batuk, dada, muntah, diare dan sakit perut. Masa inkubasi penyakit ini berkisar antara 1-4 minggu. Apabila dua minggu tidak diobati penyakit ini dapat berlanjut menjadi pneumonia (30-50%), radang hati (hepatitis), miokarditis, perikarditis, meningoensefalitis dan plasentitis (pada wanita). Kematian pada kasus akut dapat mencapai 1-2% (CDC 2005; CFSPH 2007).

Apabila penyakit *Q fever* yang bersifat akut berlangsung selama 6-12 bulan tanpa pengobatan yang efektif, maka 2-10% dari kasus tersebut akan menjadi kronis, seperti

endokarditis, infeksi osteoartikular dan pneumonia fibrosis. Kematian pada penderita kasus kronis bisa mencapai 25-65% (bila mempunyai faktor immunosupresan), sehingga dari segi kesehatan masyarakat veteriner, penyakit *Q fever* perlu mendapat perhatian yang serius (CDC 2005).

Diagnosis yang tepat secara klinis terhadap *Q fever* sangat sulit dilakukan karena tidak ada gejala klinis yang khas pada hewan maupun manusia. Untuk itu diperlukan teknik diagnosis laboratorium yang tepat serta didukung peralatan yang memadai. Diagnosis *C. burnetii* dapat dilakukan menggunakan uji serologis maupun melalui pendekatan molekuler menggunakan teknik PCR (Fournier *et al.* 1998). Beberapa metode serodiagnosis yang telah diterapkan untuk pemeriksaan *Q fever* adalah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *capillary tube microagglutination*, *complement fixation test* (CFT) dan *indirect immunofluorescent antibody* (IFA). Diagnosis paling akurat terhadap *Q fever* adalah dengan metode *nested PCR* (Setiyono, 2005; Zhang, 1998).

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui tingkat sensitivitas dan spesifisitas metode *nested PCR* dibandingkan dengan PCR untuk mendeteksi keberadaan DNA *C. burnetii*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalivet) Bogor pada bulan Februari sampai dengan Maret 2010.

DNA murni yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNA *C. burnetii* Nine Mile 2 ATCC (NM2) (Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Standort Gießen, Jerman) dan *Brucella abortus* ATCC 23452, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Campylobacter jejuni* ATCC 33291. Bahan untuk PCR adalah dua pasang primer, yaitu OMP1-OMP2 eksternal (Sigma) dan OMP3-OMP4 internal (Sigma), air *milli Q*, PCR bufer (Sigma), MgCl₂ 15 mM (Sigma), dNTP 2 mM (Vivantis), *Taq*TM DNA polymerase (Vivantis), *ethidium bromide* dan *agarose* (Vivantis)

Alat yang digunakan adalah mikropipet, GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystem), elektroforesis (BioRad), spektrofotometer (NanoDrop, ND 1000), *freezer*, refrigerator, *UV illumination* (TM-20 UVP, Inc) dan kamera polaroid.

Optimasi dan Nested PCR

Untuk menentukan tingkat optimasi (optimalisasi) PCR dan *nested* PCR dalam mendeteksi keberadaan DNA *C. burnetii*, maka pengujian dilakukan dengan mengukur konsentrasi awal DNA menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi DNA dibuat menjadi 150 nano gram/ μ l (ng/ μ l), sehingga diperoleh konsentrasi akhir dalam reaksi PCR sebesar 75 ng/ μ l. DNA *C. burnetii* tersebut diencerkan menjadi 30 ng/ μ l, 15 ng/ μ l, 3 ng/ μ l, 300 piko gram/ μ l (pg/ μ l), 30 pg/ μ l, 3 pg/ μ l, 0,3 pg/ μ l dan 0,03 pg/ μ l. Masing-masing konsentrasi tersebut diamplifikasi dengan menggunakan satu pasang primer (OMP1-OMP2) untuk PCR dan dua pasang primer eksternal (OMP1-OMP2) dan primer internal (OMP3-OMP4) untuk *nested* PCR.

Untuk mengetahui tingkat spesifitas metode *nested* PCR, maka dilakukan pendeteksian terhadap bakteri yang menyebabkan gangguan reproduksi seperti kejadian abortus pada ruminansia, yaitu *B. abortus* dan beberapa bakteri yang dalam satu famili *Proteobacteria*, yaitu *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *C. jejuni*.

Primer dan Amplifikasi DNA

Primer oligonukleotida yang digunakan adalah primer OMP1 (5'-AGT AGA AGC ATC CCA AGC ATT G-3'), OMP2 (5'-TGC CTG CTA GCT GTA ACG ATT G-3'), OMP3 (5'-GAA GCG CAA CAA GAA GAA CAC-3') dan OMP4 (5'-TTG GAA GTT ATC ACG CAG TTG-3") Sigma yang didisain dari sekuen nukleotida gen *com 1* yang mengkode OMP 27 kD dan digunakan untuk mengamplifikasi fragmen sepanjang 501 pb dan 438 pb (Hendrix, 1993; Seshadri, 2003; Zhang, 1998).

Untuk primer OMP1-OMP2 dan OMP3-OMP4, amplifikasi pertama dilakukan dalam volume 50 μ l yang berisi 13 μ l air *milli Q*, 10 x PCR bufer 5 μ l dengan konsentrasi $MgCl_2$ 15 mM (Sigma), 5 μ l dNTP 2 mM (Vivantis), 0,5 μ l primer OMP1 100 μ M, 0,5 μ l primer OMP2 100 μ M, 1 μ l *Taq* DNA *polymerase* (Vivantis) dan 25 μ l sampel DNA. Analisis PCR dilakukan berturut-turut, yaitu temperatur 94°C, 3 menit (pre-denaturasi), 1 putaran, kemudian denaturasi pada temperatur 94°C, 1 menit, pelekatan (*annealing*) pada temperatur 54°C, 1 menit dan pemanjangan (*extention*) pada temperatur 72°C, 1 menit selama 36 kali siklus serta temperatur 72°C, 4 menit dan *hold temperature* 4°C, 1 putaran menggunakan DNA

thermal cycler. Untuk amplifikasi kedua yaitu campuran reaksinya volume 50 μ l yang berisi 37 μ l air *milli Q*, 10 x PCR bufer 5 μ l dengan konsentrasi $MgCl_2$ 15 mM (Sigma), 5 μ l dNTP 2 mM (Vivantis), 0,5 μ l primer OMP3 100 μ M, 0,5 μ l primer OMP4 100 μ M, 1 μ l *Taq* DNA *polymerase* (Vivantis) dan 1 μ l produk hasil amplifikasi pertama digunakan sebagai *DNA template*, sedangkan analisis PCR sama dengan amplifikasi pertama.

Deteksi PCR

Produk amplifikasi PCR dianalisis dengan elektroforesis menggunakan 2% gel *agarose* (Vivantis), yaitu sebanyak 4 gram *agarose* ditambahkan ke dalam 200 ml 1 x TAE. Setelah cetakan *agarose* direndam dengan 1 x TAE, maka ke dalam sumur dimasukkan sampel, kontrol (positif) dan standar bobot molekul DNA (100 pb *DNA ladder*) yang telah dicampur *loading dye* dengan perbandingan 1:9. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100 volt selama 45 menit. Kemudian diwarnai dengan etidium bromida (0,5 μ g/ml) selama 30 menit, hasilnya dilihat menggunakan *UV illumination* pada 320 nm dan dipotret dengan kamera polaroid.

Hasil PCR dinyatakan positif apabila terlihat adanya produk yang spesifik dari primer eksternal (OMP1-OMP2) yang menghasilkan fragmen 501 pb, sedangkan *nested* PCR dari primer internal (OMP3-OMP4) menghasilkan fragmen 438 pb.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sensitivitas PCR

Hasil uji *nested* PCR menunjukkan bahwa tingkat optimasi menggunakan satu pasang primer eksternal (OMP1-OMP2) hanya mempunyai kemampuan mendeteksi keberadaan DNA *C. burnetii* 15 ng (15000 pg), sedangkan dengan dua pasang primer eksternal (OMP1-OMP2) dan primer internal (OMP3-OMP4) memiliki kemampuan mendeteksi hingga 300 pg (Tabel 1 dan Gambar 1).

Penggunaan dua pasang primer OMP1-OMP2 dan OMP3-OMP4 50 kali lebih sensitif dibandingkan dengan satu pasang primer OMP1-OMP2 (Tabel 1 dan Gambar 1), sedangkan Ogawa (2004) melaporkan primer OMP1-OMP2 dan OMP3-OMP4 10 kali lebih sensitif dibandingkan dengan primer CB1 dan CB2.

Nested PCR lebih sensitif dibandingkan dengan PCR. Hal ini disebabkan karena *nested* PCR menggunakan produk hasil PCR dari primer eksternal yang diamplifikasi kembali menggunakan primer internal sehingga dengan konsentrasi yang rendahpun, DNA *C. burnetii* dapat dideteksi. Selain itu *nested* PCR tidak menghasilkan target yang non spesifik, sedangkan dengan uji PCR masih terdeteksi adanya target yang non spesifik yaitu pada pita 150 pb (Gambar 1).

Menurut Zhang (1998) satu sel bakteri *C. burnetii* setara dengan konsentrasi DNA 5 fg, sehingga bila diperoleh 300 pg maka sensitivitas metode *nested* PCR dapat mendeteksi sebanyak 6×10^4 sel bakteri. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Tatsumi (2006) bahwa pada sampel telur dengan konsentrasi bakteri antara 10^4 sampai dengan 10^6 dapat dideteksi dengan metode *real time* PCR (*quantitative PCR test*).

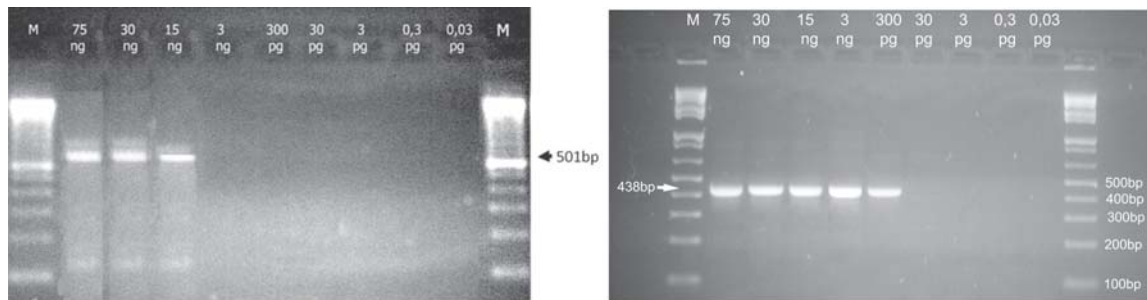
Dari penelitian yang dilakukan Ogawa (2004) menunjukkan bahwa primer OMP1-OMP2 dan OMP3-OMP4 dapat mendeteksi sebanyak enam sel bakteri per tabung PCR atau setara dengan 2×10^2 sel bakteri per sampel.

Tabel 1 Perbandingan sensitivitas PCR dan *nested* PCR dalam mendeteksi DNA *C. burnetii* dengan konsentrasi 75 ng/ μ l sampai dengan 0.03 pg/ μ l

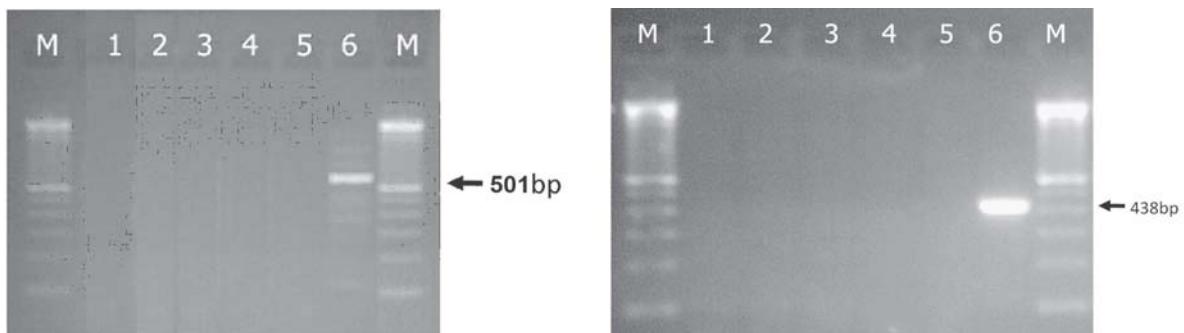
Konsentrasi DNA	PCR	<i>nested</i> PCR
75 ng/ μ l	+	+
30 ng/ μ l	+	+
15 ng/ μ l	+	+
3 ng/ μ l	-	+
300 pg/ μ l	-	+
30 pg/ μ l	-	-
3 pg/ μ l	-	-
0.3 pg/ μ l	-	-
0.03 pg/ μ l	-	-

Primer CB1 dan CB2 hanya dapat mendeteksi 60 sel bakteri per tabung PCR atau setara dengan 2×10^3 sel bakteri per sampel.

Hirai (2005) telah mengembangkan metode *nested* PCR untuk mendeteksi *C. burnetii* pada telur yaitu dengan menambahkan $3,2 \times 10^1$ sel bakteri *C. burnetii* ke dalam 1 gram kuning telur.



Gambar 1 Sensitivitas PCR (a) dan *nested* PCR (b) menggunakan konsentrasi DNA *C. burnetii* 75 ng/ μ l sampai dengan 0,03 pg/ μ l. (kolom M: DNA ladder 100 pb).



Gambar 2 Uji Spesifisitas DNA *C. burnetii* dengan metode PCR (a) dan *nested* PCR (b). (kolom 1: kontrol negatif/dH₂O, kolom 2: *B. abortus*, kolom 3: *E. coli*, kolom 4: *P. aeruginosa*, kolom 5: *C. jejuni*, kolom 6: *C. burnetii* dan kolom M: DNA ladder 100 pb).

Penelitian selanjutnya mendapatkan limit deteksi *C. burnetii* dengan metode *nested* PCR pada pangan asal hewan yaitu 10^3 sel per 1 ml susu sapi atau domba, 10^2 sel per 1 ml susu kambing dan 10^2 sel per 15 mg kuning telur (Fretz *et al.*, 2007), serta 5×10^2 sel bakteri per 50 gram mayones (Sadamasu, 2006).

Selain itu primer yang didisain dari sekuen nukleotida gen *com 1* lebih sensitif dibandingkan dengan sepasang primer Q3-Q5 dan Q4-Q6 untuk mendeteksi *C. burnetii* pada sampel serum darah dengan metode *nested* PCR (Zhang, 1998).

Spesifisitas PCR

Hasil uji spesifisitas menggunakan satu pasang primer eksternal (OMP1-OMP2) maupun dua pasang primer eksternal (OMP1-OMP2) dan primer internal (OMP3-OMP4) menunjukkan spesifik untuk mendeteksi DNA *C. burnetii* (*conserved*). Hal ini dapat dilihat dengan adanya pita spesifik pada DNA *C. burnetii* dan tidak terjadi hibridisasi silang (*cross-hybridization*) dengan DNA *B. abortus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *C. jejuni* (Gambar 2).

Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *B. abortus* yang dapat menyebabkan gejala klinis yang sama dengan *C. burnetii* seperti abortus pada ruminansia dan beberapa bakteri dari kelompok famili *Proteobacteria* sub divisi gamma (*E. coli*, *P. aeruginosa*) dan delta (*C. jejuni*) tidak terjadi amplifikasi silang (*cross amplification*), sehingga penggunaan primer OMP1-OMP2 dan OMP3-OMP4 sangat spesifik untuk mendeteksi DNA *C. burnetii*.

Hasil penelitian Ogawa (2004) juga menunjukkan bahwa terdapat pita yang spesifik dari *C. burnetii* dibandingkan 12 bakteri lain (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae*, *Chlamydia pneumoniae*) dengan menggunakan primer eksternal (OMP1-OMP2) dan primer internal (OMP3-OMP4).

Primer ini sangat sensitif dan spesifik terhadap 21 strain *C. burnetii* dan sudah digunakan sebagai metode diagnosa laboratorium yang akurat dalam mendeteksi *C. burnetii* pada fase akut *Q fever* (Ogawa, 2004; Zhang, 1998).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sensitivitas metode *nested* PCR sangat memadai untuk mendeteksi keberadaan DNA *C. burnetii* dengan konsentrasi > 300 pg, sehingga pada bahan pangan asal hewan seperti telur yang mengandung DNA *C. burnetii* dengan konsentrasi < 300 pg tidak dapat terdeteksi.

SIMPULAN

Metode *nested* PCR merupakan metode yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi keberadaan DNA *C. burnetii*.

Tingkat sensitivitas metode *nested* PCR menggunakan primer eksternal (OMP1-OMP2) dan primer internal (OMP3-OMP4) memiliki kemampuan mendeteksi DNA *C. burnetii* hingga konsentrasi > 300 pg.

Metode *nested* PCR mempunyai spesifisitas yang tinggi (*conserved*) untuk mendeteksi DNA *C. burnetii*.

DAFTAR PUSTAKA

- Acha PH, Szyfres B. 2003. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*, Vol II. 3rd ed, Chlamydioses, Rickettsioses and Viroses. Washington : Pan American Health Organization hlm 16-27.
- Angelakis E, Raoult D. 2010. *Q Fever*. *Vet Microbiol* 140:297-309.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2005. *Q Fever*. National Center for Infectious Diseases, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Viral and Rickettsial Zoonoses Branch, Atlanta, Georgia USA. Last review hlm 1-5.
- [CFSPH] Center for Food Security and Public Health. 2007. *Q Fever*. Ames Iowa USA: Iowa State University College of Veterinary Medicine. Last update hlm 1-6.
- Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. 1998. Diagnosis of *Q Fever*. *J Clin Microbiol* 36(7): 1823-1834.
- Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A. 2007. Screening of Various Foodstuffs for Occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 116:414-418.
- Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE. 1999. Developmental Biology of *Coxiella burnetii*. *Trends in Microbiol* 7(4):149-154.

- Hendrix LR, Mallavia LP, Samuel JE. 1993. Cloning and Sequencing of *Coxiella burnetii* Outer Membrane Protein Gene *com I*. *Infect and Immunol* 61:470-477.
- Hirai A. 2005. Investigation of *Coxiella burnetii* Contamination in Commercial Milk and PCR Method for The Detection of *Coxiella burnetii* in Egg. *Shokukin Eiseigaku Zasshi* 46(3):86-92.
- Maurin M, Raoult D. 1999. Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 12(4):518-553.
- Milazzo A. 2001. Sexually Transmitted Q Fever. *Clin Infect Dis* 33(3):399-402.
- Mine Y. 2008. *Egg Bioscience and Biotechnology*. Wiley-Interscience. New Jersey : A John Wiley and Sons, Inc. Publication.
- Ogawa M. 2004. Evaluation of PCR and Nested PCR Assays Currently used for Detection of *Coxiella burnetii* in Japan. *SA J Trop Medic Publ Health* 35(4):151-154.
- Sadamasu K. 2006. Development of Effective Detection Method for *Coxiella burnetii* in Mayonnaise by Real Time PCR and Investigation of *C. burnetii* Contamination in Commercial Mayonnaise in Tokyo. *Shokukin Eiseigaku Zasshi* 47(1):1-8.
- Seshadri R. 2003. Complete Genome Sequence of the Q Fever Pathogen *Coxiella burnetii*. *PNAS* 100(9): 5455-5460.
- Setiyono A. 2005. New Criteria for Immunofluorescent Assay for Q Fever Diagnosis in Japan. *J Clin Microbiol* 43:5555-5559.
- Tatsumi N, Baumgartner A, Qiao Y, Yamamoto I, Yamaguchi K. 2006. Detection of *Coxiella burnetii* in Market Chicken Eggs and Mayonnaise. *Annu NY Sci* 1078:502-505.
- Vaidya VM, Malik SVS, Kaur S, Kumar S, Barbuddhe SB. 2008. Comparison of PCR, immunofluorescence Assay, and Pathogen Isolation for Diagnosis of Q Fever in Human with Spontaneous Abortions. *J Clin Microbiol* 46(6):2038-2044.
- Zhang GO. 1998. Clinical Evaluation of New PCR Assay for Detection of *Coxiella burnetii* in Human Serum Samples. *J Clin Microbiol* 36:77-80.