

***Theileria annulata* DNA'sının loop aracılı izotermal yöntemle (LAMP) çoğaltılması ***

**Hüseyin Bilgin BİLGİÇ¹, Tülin KARAGENÇ¹, Serkan BAKIRCI¹, Hasan EREN¹,
William WEIR²**

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın; ²Glasgow University, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Bearsden Road, Glasgow, UK.

Özet: Son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) alternatif olarak termal siklus kullanmadan izotermal koşullar altında hedef bölgelerin çoğaltılmasına olanak sağlayan LAMP (loop mediated isothermal amplification) gibi yeni teknikler geliştirilmiştir. LAMP, yüksek özgünlükte ve kısa zamanda çok sayıda hedef DNA kalıbının çoğaltılabildiği ve elde edilen ürünün kolay ve hızlı tespitine olanak veren bir yöntemdir. Bu çalışmada, *Theileria annulata*'nın merozoit yüzey antijeni (Mero1), 30 kDa major merozoit yüzey antijeni (Tams-1) ve sitokrom b genlerini çoğaltmak için özgül olarak tasarlanan primer çiftleri kullanılarak, hasta ve taşıyıcı sığırlarda *T. annulata*'nın tespitinde LAMP yönteminin özgüllük ve duyarlılığı değerlendirilmiştir. En yüksek duyarlılığa sahip olan primer çiftleri ile LAMP'ın sahadan toplanan örneklerde uygulanabilirliği araştırılmıştır. Sitokrom b genine özgü iki primer çiftinin (CYTOB1 ile CYTOB341) *T. annulata*'nın farklı izolatlarını özgül olarak çoğalttığı ve BL20 ve diğer türlere ait DNA'larda ise herhangi bir çoğalma olmadığı belirlenmiştir. CYTOB1 primerleri 2 fg'a kadar *T. annulata* Ankara / D7 DNA'sını tespit edebilmiş, bununla birlikte CYTOB341'in duyarlılığı CYTOB1'ye oranla 10 kat düşük bulunmuştur. Yapılan analizlerde, CYTOB1 LAMP'ının duyarlılığı F3/B3 PZR ile aynı bulunmuş, ancak CYTOB1 F3/B3 PZR'in duyarlılığının cyto1 PZR'ye oranla 10 kat daha az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, LAMP ürünlerinin özgüllükleri restriksiyon enzimi ile keserek ve sekans analizleri ile doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, sitokrom b geni dışında hedef gen bölgelerine (Tams-1 ve Mero1) özgü tasarlanan primer çiftlerinin hiçbirinin *T. annulata*'nın farklı izolatlarını özgül ve duyarlı olarak tespit etmediğini göstermiştir. Sonuç olarak, CYTOB1 LAMP yönteminin *T. annulata*'nın saha şartlarında tespitinde kullanılabilirliğinin cyto1 PZR'ye oranla düşük olduğu saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: DNA, LAMP, tanı, *Theileria annulata*.

Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of *Theileria annulata* DNA

Summary: In the past three decades, as an alternative to PCR (polymerase chain reaction) new diagnostic techniques like LAMP (loop mediated isothermal amplification) whereby target DNA can be amplified under isothermal conditions without using thermocycler have been developed. The LAMP method allows the synthesis of large amounts of DNA in a short time with high specificity and rapid and easy detection of generated products. In this study, specificity and sensitivity of LAMP method was evaluated for the detection of *T. annulata* in acute infected and/or carriers cattle using primer pair specifically designed to amplify merozoite surface antigen gene (Mero1), 30 kDa major merozoite surface antigen gene (Tams-1) and cytochrome b gene of *T.annulata*. Primer pairs with highest sensitivity were used to evaluate the applicability of LAMP to the field samples. Two LAMP primers (CYTOB1 and CYTOB341) targeting cytochrome b gene specifically amplified DNA of different *T. annulata* isolates successfully while no amplification was seen in other species DNAs and BL20. CYTOB1 primers detected *T. annulata* Ankara / D7 DNA up to 2 fg, however the detection limit of CYTOB341 was 10 fold lower. The sensitivity of CYTOB1 LAMP assay was same with F3/B3 PCR, however when compared with that of cyto1 PCR a 10 fold lower sensitivity was found. The LAMP product was confirmed by restriction digestion and sequencing. Results obtained from this study indicated that none of the designed primer pairs specific to target genes (Tams-1 and Mero1), except cytochrome b gene was able to specifically and sensitively detect different isolates of *T. annulata*. Consequently, it was shown that LAMP method using CYTOB1 primers is less effective than the cyto1 PCR in terms of detecting *T. annulata* in the field samples.

Keywords: Diagnosis, DNA, LAMP, *Theileria annulata*.

* Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Programı (BAP) (Proje No; VFT-06006) ve Wellcome Trust (Ref. No; 075820/A/04/Z) tarafından desteklenen doktora projesi kapsamında yapılmıştır.

Giriş

Biyoteknoloji alanındaki yenilikler nükleik asit teknolojilerini olası ihtimaller olmaktan çıkarıp hastalık etkenlerinin belirlenmesinde rutin laboratuvar teknikleri ve modelleri haline getirmiştir (7). Tanısal amaçlı kullanılan bu yeni tekniklerin özellikle saha şartlarında kolay adapte olabilen, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip, çoğaltılacak son ürünün rahat ve basit bir yöntemle değerlendirilebilmesi olanak sağlaması önemlidir. Nükleik asit çoğaltma tekniklerinin başını çeken polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) araştırmacılar tarafından yoğun olarak kullanılıyor olmasına karşın reaksiyonun oluşup hedef bölgenin çoğaltılmasında termal sikluslu makinelere ihtiyaç duyulması bu tekniğin saha şartlarına adapte edilip kullanılmasını kısıtlamaktadır. Son yıllarda termal siklusa ihtiyaç duymadan izotermal koşullar (63-65°C) altında hedef bölgelerin çoğaltılmasına olanak sağlayan LAMP (loop mediated isothermal amplification) gibi yeni teknikler geliştirilmiştir (7). LAMP, hedef DNA'nın 3' ve 5' ucundaki adlı altı farklı bölgeye (F3c, F2c ve F1c ile B1, B2 ve B3) özgü F3, FIP, B3 ve BIP olmak üzere dört tip primer kullanarak ısı denatürasyonuna gerek kalmadan (20) zincir yer değiştirme aktivitesine sahip *Bst* DNA polimeraz enzimi yardımı ile çok az sayıdaki hedef DNA'yı, özgül olarak, kısa zamanda 10^9 kopyaya çoğaltılabilen bir yöntemdir (7, 21, 25). Buna ilave olarak çoğaltılan ürünler agaroz jel elektroforezi, gözle görünür türbitide veya floresans özellikleri ile hem laboratuvar koşullarında hem de saha şartlarında kolay ve etkin olarak belirlenebilmektedir (18, 25, 31). LAMP yöntemi son yıllarda, tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesine dayalı genetik çalışmalar ile viral, bakteriyel ve paraziter etkenlerin tanısal amaçlı belirlenmesinde giderek artan oranda kullanılmaya başlanmıştır. Paraziter kökenli hastalıklardan equine piroplazmosis (2, 3, 32), tropikal theileriosis (15, 28), East Cost Fever (ECF) (29) ile sığır babesiosis (10, 14) etkenlerinin ve koyunlarda hastalık oluşturan *Theileria* ve *Babesia* soyaundaki kan parazitlerinin (8, 16, 27), *Giardia duodenalis* (26) ve *Cryptosporidium* türlerinin (5, 12), *Trypanosoma brucei gambiense*'nin (13), köpeklerde *B.gibsoni* (17, 9) ve *B.canis* (1, 19) ile ara konak sivrisineklerdeki *Plasmodium* spp.'lerin (4) teşhisi amacıyla LAMP yöntemi kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmada, LAMP yöntemi farklı gen bölgelerine özgü primer çiftleri kullanılarak *T.annulata*'nın hasta ve/veya taşıyıcı hayvanlarda tespitinde özgüllük ve duyarlılıkları yönünden karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda en yüksek duyarlılığa sahip olan primer çiftleri kullanılarak LAMP'ın sahadan toplanan örneklerde uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan primerlerin tasarlanması ve bunlara ait nükleotid dizimleri: Theileria annulata'nın

LAMP yöntemi ile tespitinde kullanılmak üzere ilk ikisi tek kopyalı ve üçüncüsü de muhtemel çoklu kopyaya sahip olan sırasıyla merozoit yüzey antijen geni (Mero1), 30 kDa major merozoit yüzey antijen geni (Tams-1) ve sitokrom b gen bölgelerine özgü primerler tasarlanmıştır. Her gen bölgesine özgü primer setleri (F3/B3 ve FIP/BIP) 'Primer Explorer V3' adlı bilgisayar programı (<http://primerexplorer.jp/e>) kullanılarak tasarlanmıştır. Her gen için tasarlanan primer çiftlerinden 5'/3' stabiliteleri en yüksek olanlar ($\Delta G \leq -4$ kcal/mol) ile primer-dimer oluşturma oranları en düşük olanlardan üçer adet seçilmiştir. LAMP metodu ile *T. annulata* DNA'sını çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri, bunların tasarlandığı gen bölgeleri ile dizimleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tasarlanan primerlerin LAMP yöntemi ile değerlendirilmesi: LAMP reaksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanan primerlerin özgüllükleri *T.annulata*'nın farklı izolatları (Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrail, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır), *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. phagocytophila* türleri ile, BL20 (bovine lenfosarkoma hücreleri), enfekte olmayan sığır periferik kan hücrelerine ait toplam 20 DNA örneği kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla yapılan LAMP reaksiyonu 25 µl'lik son hacimde; 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 8mM MgSO₄, %0.1 Triton X-100, 0.8M Betaine (Sigma-Aldrich, Amerika), her bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1.4mM, 8U *Bst* DNA polimeraz (New England Biolabs, İngiltere), 1.6µM ileri ve geri yönlü iç primerler (FIP/BIP), 0.2µM F3 ve B3 dış primerleri ile 1 µl DNA örneği kullanılmıştır. Reaksiyon 65°C sabit ısıda 90 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir ve bunu takiben reaksiyon 80°C'de 4 dakika inkübe edilerek durdurulmuştur. Ayrıca, Iseki ve ark. (10) tarafından *B. bovis*'in LAMP yöntemi ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri (Tablo 1) *B. bovis*'in Afrika (Kusanyangwa, Kuwangya), Meksika (Meksiko, M07, Lismore), İsrail (saha suşu I, II ve aşı suşu I, II), Aydın izolatlarının değerlendirilmesi ve bu çalışmada tasarlanan primerler kullanılarak yapılan LAMP reaksiyonlarında internal kontrol olması amacıyla kullanılmıştır. LAMP reaksiyonu *B. bovis* primerleri kullanılarak yukarıda anlatıldığı şekilde 63°C sabit ısıda 90 dakika boyunca yapılmış ve takiben reaksiyon 80°C'de 3 dakika inkübe edilerek durdurulmuştur. Her iki reaksiyon sonucunda elde edilen LAMP ürünleri oda ısısı ya da 4°C'de tutulmuştur.

LAMP ürünlerinin incelenmesi: LAMP yöntemi ile çoğaltılan ürünler agaroz jel elektroforezi ya da çıplak gözle incelenebilmektedir. Bu amaçla yapılan agaroz jel elektroforezde her LAMP ürününden 10 µl alınarak mililitresinde 10 µl ethidium bromid bulunan %1,5'lik agaroz jelde, 100 voltluk akımda bir saat elektroforez sonrası ultraviole ışık altında görüntülenmiştir. Bunun yanında,

LAMP reaksiyonunda pyrofosfat iyonları DNA polimerizasyonu sırasında kullanılan deoksiniükleotidtrifosfat'lardan son ürün olarak açığa çıkmaktadır $[(DNA)_n-1+dNTP \rightarrow (DNA)_n+P_2O_7^{4-}]$. Oluşan pirofosfat iyonlarının ($P_2O_7^{4-}$) miktarı arttıkça LAMP reaksiyonunda kullanılan tampon solüsyonda bulunan magnezyum iyonları ile reaksiyona girerek magnezyum pirofosfat $[P_2O_7^{4-}+2Mg^{2+} \rightarrow Mg_2P_2O_7]$ şeklinde çökelti oluşmaktadır ve bu da çıplak gözle bakıldığında tüpte bulanıklık şeklinde görülmektedir (18). Çıplak gözle incelemede kullanılan bir diğer yöntemde, reaksiyonda kullanılan tüpe 1 µl Syber Green I (Invitrogen™) eklendiğinde pozitif olan tüplerde orijinal turuncu renk yeşile dönüşmekte, negatif olan tüplerde ise herhangi bir renk değişikliği olmadan turuncu renk kendini muhafaza etmektedir. Bu amaçla, her tüpe 1 µl 1/10 oranında sulandırılmış, Syber Green I (Invitrogen™) eklenerek pozitif örneklerdeki renk değişimi incelenmiştir.

LAMP ürünlerinin EcoRI restriksiyon enzimi kullanılarak kesilmesi: Çoğaltılan LAMP ürünlerinde FIP ve BIP primerlerinin sırasıyla F2–F1c ve B2–B1c bölgeleri arasında bulunan boşlukta yer alan restriksiyon bölgesi (GAATTC) (Tablo 1) EcoRI restriksiyon enzimi (New England Biolabs, İngiltere) ile kesilmesi amacıyla ilk olarak LAMP ürünleri QIAquick PZR pürifikasyon kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünlerin DNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra 1 µg DNA örneği 1 U EcoRI enzimi ile 37°C'de gece boyunca inkübe edilerek ilgili bölgelerinden kesilmiş ve daha sonra enzimin inaktivasyonu için 65°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Kesilen ürünler mililitresinde 10 µl ethidium bromid bulunan %2 agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviyole ışık altında incelenmiştir.

LAMP yöntemi ile PZR'nin duyarlılığının karşılaştırılması: LAMP yönteminin duyarlılığının belirlenmesi ve bunun LAMP reaksiyonunda kullanılan dış primerler (F3/B3) ile cytob1 primer çiftleri (6) kullanılarak yapılan iki ayrı PZR ile karşılaştırılması amacıyla deneysel enfekte buzağıdan alınan kan, enfekte olmayan buzağıdan alınan kan ile 10^{-1} – 10^{-10} parazitemi olacak şekilde 10 katlı sulandırılmış ve bunlardan DNA izole edilmiştir. Ayrıca, hazırlanan sulandırmalardan Whatmann® FTA kartları (Sigma-Aldrich) üzerine damlatılarak DNA izolasyonu yapıncaya kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir. Bunun yanında, LAMP ile PZR'nin duyarlılıkları üzerine biyolojik ajanlar ile ortamda bulunan parazite ait başlangıç DNA miktarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla yukarıda bahsedilen dilüsyona ilave olarak *T.annulata* Ankara/D7 *in vitro* makroşizont hücre kültürü ile saflaştırılarak hazırlanmış *T.annulata* Ankara/C9 piroplazmindan hazırlanan DNA örnekleri deiyonize H₂O ile 10 katlı sulandırılarak LAMP yöntemi ile değerlendirilmiştir. F3/B3

ve cytob1 primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR 50µl'lik son hacimde; 45 mM Tris–HCl, pH 8.8, 11 mM (NH₄)₂SO₄, 4.5 mM MgCl₂, 0.113 mg/ml BSA, 4.4 µM EDTA, her bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'tan 1 mM, 1 U Ampli Taq DNA polimeraz (Applied Biosystems), 10 µM ileri ve geri yönlü primer çifti ile 2 µl DNA örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri 4°C'de tutulmuştur. Daha sonra her LAMP ve PZR ürününden 10 µl olmak koşuluyla mililitresinde 10 µl ethidium bromid bulunan %1.5'lik agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviyole ışık altında incelenmiştir.

F3/B3 primer çifti kullanılarak yapılan PZR ürünlerinin sekans analizleri için klonlanması: LAMP yönteminde hedef DNA bölgesinin doğrulanması ve *T.annulata*'nın farklı izolatları (Ankara/D7, Dalama, Diyarbakır, Akçaoğlu, Aydın ve Pendik) arasında herhangi bir farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla F3/B3 primer çiftleri ile PZR'de çoğaltılan 185 bp'lık bölge TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen™) kullanılarak PCR-4 TOPO vektörü içerisine klonlanmış ve pozitif koloniler seçilerek sekans analizlerinin yapılması için ticari bir şirkete gönderilmiştir (MWG Biotech, Almanya).

LAMP yönteminin saha şartlarında denenmesi: LAMP yönteminin saha şartlarında denenmesi amacıyla tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerden toplanan toplam 52 pozitif kan örneğinden hazırlanan DNA örnekleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlar cytob1 PZR ile karşılaştırılmıştır. Toplanan kanlar için etik komite onayı ADÜ-HADYEK'in 07.02.2006 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2006/0022 numaralı kararı gereğince yapılmıştır.

Bulgular

Tasarlanan LAMP primerleri ile elde edilen sonuçlar: LAMP metodu ile *T. annulata* DNA'sını çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri, bunların tasarlandığı gen bölgeleri ile dizilimleri Tablo 1'de gösterilmiştir. *T. annulata*'nın LAMP yöntemi ile tespiti merozoit yüzey antijen geni (Mero1), 30 kDa major merozoite yüzey antijen geni (Tams-1) ve sitokrom b genine özgü olarak tasarlanan tüm primerlerin özgüllükleri *T. annulata*'nın farklı bölgelere ait izolatları kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 2'de özetlenmiştir. LAMP reaksiyonlarında internal kontrol olması amacıyla kullanılan ve Iseki ve ark. (10) tarafından *B. bovis*'in LAMP yöntemi ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri *B. bovis*'in Afrika (Kusanyangwa, Kuwangya), Meksika (Meksiko, M07, Lismore), İsrail (saha suşu I, II ve aşı suşu I,II), Aydın gibi farklı coğrafik bölgelere ait izolatlardan sadece Kuwangya, M07 ve Lismore izolatlarını çoğaltırken kullanılan diğer izolatlarda herhangi bir ürün oluşmamıştır.

Tablo 1. *T. annulata* DNA' sını çoğaltmakta kullanılan LAMP primerleri ve primerlerin tasarlandığı gen bölgeleri.
Table 1. LAMP primers used to amplify *T. annulata* DNA and target genes used to design primers.

Gen adı	Tür adı	Primer adı	Nükleotid Dizilimi ^a	Kaynak
Merozoit yüzey antijen geni (Mero - 1)	<i>T. annulata</i>	Mero21	F3 ; TCCTCTCTTGATATTGACAAAAG / B3 ; AGACCTTCACATAGTGACG FIP ; GCCCTCTTTCTTGAATGTATACCG GAATTC CAACTGCCACTGACAGAC BIP ; TAATGTGAACATGTTTACTTCGGC GAATTC CAAGTCACACCTCATATCATTTGT	Bu çalışma
		Mero 25	F3 ; GATATTGACAAAAGATTCAACTGC / B3 ; AGACCTTCACATAGTGACG FIP ; GCCCTCTTTCTTGAATGTATACCG GAATTC CAACTGACAGACTTGTCTGT BIP ; TAATGTGAACATGTTTACTTCGGC GAATTC CAAGTCACACCTCATATCATTTGT	" "
		Mero26	F3 ; GATATTGACAAAAGATTCAACTGC / B3 ; AGACCTTCACATAGTGACG FIP ; GCCCTCTTTCTTGAATGTATACCG GAATTC CAACTGACAGACTTGTCTGT BIP ; TAATGTGAACATGTTTACTTCGGC GAATTC CAAGTCACACCTCATATCATTTGT	" "
	<i>T. annulata</i>	Tams416	F3 ; ACTGGAAGATGTACACCTT / B3 ; GTCCTTAAGCTCGAAAGTAGG FIP ; TTGGCATTGTTTGGTTTCCGAC GAATTC CGGAATTTAAACCTTCCAAAGTCA BIP ; TGTTGGTTCTGATTCCAAAGAAAGT GAATTC CTTCAACCTTGAGTCACCG	Bu çalışma
		Tams417	F3 ; AACCTTCCAAAGTCACCTT / B3 ; CCTGTGTCACTTTGAACCCCA FIP ; AGAACCAACAAAACCAACTTCA GAATTC CGACAAAGAAAGTCGGAA BIP ; CCAAGAAAGTTCGTCAAACTCTACTA GAATTC CTTATCGTCTTAAAGCTCGA	" "
		Tams898	F3 ; ACTGGAAGATGTACACCTT / B3 ; GTCCTTAAGCTCGAAAGTAGG FIP ; TTGGCATTGTTTGGTTTCCGAC GAATTC CGGAATTTAAACCTTCCAAAGTCA BIP ; TGTTGGTTCTGATTCCAAAGAAAGT GAATTC CTTCAACCTTGAGTCACCG	" "
Sitokrom b geni	<i>T. annulata</i>	CYTOB1	F3 ; ATGTGCCAGCAAAAGGTA / B3 ; ACCAGAATACCAAGACCAA FIP ; AGACGAACAAACCAACCGAAA GAATTC TGGCTTTTGAAAGTACTTTGG BIP ; TCACTCGTTTGGAGTTTCGTTT AGATTC CGGTAATGATTACTAGATACCACA	Bu çalışma
		CYTOB 341	F3 ; CTGTGAATATTGTTAGTACTCCA / B3 ; CTAGAATACCACATACCTTTTCATG FIP ; CCAAAGTACTTCAAAAAGCCATACCG GAATTC TTATATCCGGGTTGATGCT BIP ; TGTAAACATTTGTTTCGGTTGGTT GAATTC CAAGAAGAAATAAAACGAAACTCC	" "
		CYTOB 288	F3 ; CTGTGAATATTGTTAGTACTCCA / B3 ; CTAGAATACCACATACCTTTTCATG FIP ; CGGCCAAAGTACTTCAAAAAGCC GAATTC ATTATATCCGGGTTGATGCT BIP ; TGTAAACATTTGTTTCGGTTGGTT GAATTC CAAGAAGAAATAAAACGAAACTCC	" "
		Rhoptri proteini (RAP-1) geni <i>B. bovis</i>	F3 ; ACCAAAACTATCTGAAAGCCCAATG / B3 ; GGAGCCTCCCTGAAGAAGT FIP ; AGGTTCGGTACATTCTCTTCA GAATTC TGAGCCCACTAAAAAGTTATGC BIP ; GCCAACCCACCAAGGAGTTTTC GAATTC TGGTTGGTTGACCGATGTT	İseki ve ark. (10)

(^a); dizilimin 5'-3' yönü verilmiştir. **Kalın**, gölgelenmiş, *italik* olarak yazılan '**GAATTC**' *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim bölgelerini belirtmektedir.

(^a); indicates the sequence given in 5'-3' direction. '**GAATTC**' written in the **bold**, shaded uppercase italic letters indicate *EcoRI* restriction sites.

Tablo 2. LAMP metodu ile PZR'nin özgüllük ve duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.
Table 2. Comparison of sensitivity and specificity results of LAMP method and PCR.

Dilüsyonlar	PZR			LAMP							
	cytob1	CYTOb1 F3/B3	CYTOb1	CYTOb341	CYTOb288	Mero21	Mero25	Mero26	Tams416	Tams417	Tams898
Deneyisel enf. dilüsyonları	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-
FTA kartları üzerindeki deneyisel enf. dilüsyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D7 dilüsyonları	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. annulata</i> Ankara/D7 <i>in vitro</i> makroşizont hücre kültürü dilüsyonları ^a	-	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Saflaştırılarak hazırlanmış <i>T. annulata</i> Ankara/C9 piroplazm dilüsyonları ^a	-	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. annulata</i> 'nın farklı izolatları ^b	+	+	+	+	-	-	-	-	-	zayıf ^d	zayıf ^d
Diğer DNA örnekleri ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(^a); *T. annulata* Ankara/D7 *in vitro* makroşizont hücre kültürü ve saflaştırılarak hazırlanmış *T. annulata* Ankara/C9 piroplazmından hazırlanan DNA örneklerini ifade etmektedir. (^b); *T. annulata*'nın farklı izolatlarını (Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrail, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır) ifade etmektedir. (^c); BL20, *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* ve *A. phagocytophila* türlerine ait DNA'larını ifade etmektedir. (^d); tüm izolatları özgül olarak çoğaltamamış olan primerleri ifade etmektedir.

(^a); indicates DNA samples isolated from *in vitro* macroshizont cell culture of *T. annulata* Ankara/D7 and *T. annulata* Ankara/C9 piroplasm. (^b); indicates different isolates of *T. annulata* (Tunisia, Iran, Umbanein, Gharb, Israel, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır). (^c); indicates DNA samples from BL20, *T. parva*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi*, *A. marginale*, *A. centrale* and *A. phagocytophila* species. (^d); indicates primers that are unable to specifically amplify all isolates.

(A); *T.annulata*'nın farklı izolatlarına ait DNA'ların F3/B3 primerleri kullanılarak yapılan PZR'unun sekans sonucu

```

genedb ATGTGCCAGCAAAAGGTAATGGCTTTTGAAAGTACTTTGGxxTTTCGGTTGGTTTGGTCTxxTCACCTCGTTTGGAGTTTC-TTTTAxxTGTGGTATTCTAGTAATCAATTACCTTGGTCTGGTATTCTGGT
D7 ATGTGCCAGCAAAAGGTAATGGCTTTTGAAAGTACTTTGGxxTTTCGGTTGGTTTGGTCTxxTCACCTCGTTTGGAGTTTC-TTTTAxxTGTGGTATTCTAGTAATCAATTACCTTGGTCTGGTATTCTGGT
Dalama ATGTGCCAGCAAAAGGTAATGGCTTTTGAAAGTACTTTGGxxTTTCGGTTGGTTTGGTCTxxTCACCTCGTTTGGAGTTTCATTTTAxxTGTGGTATTCTAGTAATCAATTACCTTGGTCTGGTATTCTGGT
D.Bakir ATGTGCCAGCAAAAGGTAATGGCTTTTGAAAGTACTTTGGxxTTTCGGTTGGTTTGGTCTxxTCACCTCGTTTGGAGTTTCATTTTAxxTGTGGTATTCTAGTAATCAATTACCTTGGTCTGGTATTCTGGT
A.ova ATGTGCCAGCAAAAGGTAATGGCTTTTGAAAGTACTTTGGxxTTTCGGTTGGTTTGGTCTxxTCACCTCGTTTGGAGTTTCATTTTAxxTGTGGTATTCTAGTAATCAATTACCTTGGTCTGGTATTCTGGT
Aydin ATGTGCCAGCAAAAGGTAATGGCTTTTGAAAGTACTTTGGxxTTTCGGTTGGTTTGGTCTxxTCACCTCGTTTGGAGTTTCATTTTAxxTGTGGTATTCTAGTAATCAATTACCTTGGTCTGGTATTCTGGT
Pendik ATGTGCCAGCAAAAGGTAATGGCTTTTGAAAGTACTTTGGxxTTTCGGTTGGTTTGGTCTxxTCACCTCGTTTGGAGTTTC-TTTTAxxTGTGGTATTCTAGTAATCAATTACCTTGGTCTGGTATTCTGGT
*****

```

F3

B3

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

B3

B2

B1c

B2c

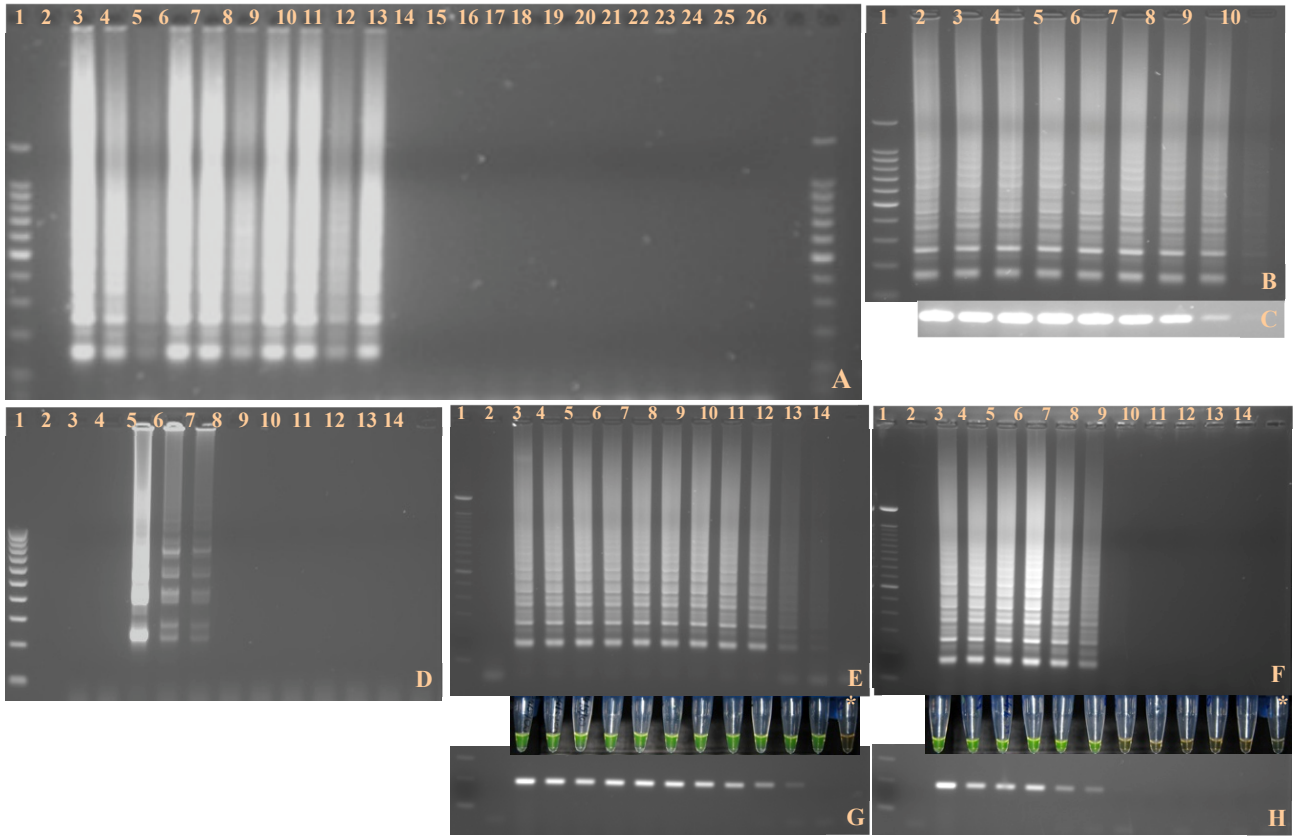
B3

B2

B1c

B2c

B3



Resim 1. (A); *T. annulata*'nın farklı izolatları ve diğer bazı *Theileria*, *Babesia* ve *Anaplasma* türlerine ait DNA örnekleri ile CYTOB1 primerleri kullanarak yapılan LAMP. Kuyu 1: 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); 2: boş; 3-12: *T. annulata*'nın sırası ile Tunus, İran, Umbanein, Gharb, İsrail, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın, Diyarbakır izolatları; 13: BL20; 14: enfekte olmayan sığır PBM; 15: *T. parva*; 16: *T. sergenti*; 17: *T. lestoquardi*; 18: *B. bovis*; 19: *B. bigemina*; 20: *T. equi*; 21: *A. marginale*; 22: *A. centrale*; 23: *A. phagocytophila*; 24: su; 25: boş; 26: 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™). (B ve C); *T. annulata*'ya ait sitokrom b genini çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri yapılan LAMP (B) ve F3/B3 primer çifti kullanılarak yapılan PZR (C)'in duyarlılığının *T. annulata*'ya ait DNA örneklerinin 10 katlı sulandırılmaları kullanılarak belirlenmesi. Kuyu 1: 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); 2-10: *T. annulata* Ankara/D7 DNA'sına ait 200 nanogram - 2 femtogram'a kadar 10 katlı sulandırmalar.

(D); *Babesia bovis* türüne ait rhoptri protein-1 geninin Iseki ve ark. (10) tarafından belirlenen primerler kullanılarak LAMP ile çoğaltılması. Kuyu 1: 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); 2: boş; 3-11: *B. bovis*'in farklı suşları (Meksiko, Kusanyangwa, M07, Lismore, Kuwanyga, İsrail saha suşu I, İsrail saha suşu II, İsrail aşı suşu I, İsrail aşı suşu II); 12: enfekte olmayan sığır PBM; 13: su; 14: *B. bovis* Aydın suşu.

(E - H); *Theileria annulata*'ya ait piroplasm (C9) ve makroşizont hücre kültüründen (D7) hazırlanan DNA'ların 10 katlı dilüsyonlarında (10^{-1} - 10^{-10}) sitokrom b genini LAMP yöntemi ile çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri (E ve F) ve PZR yöntemi ile çoğaltmada kullanılan F3/B3 primerlerinin (G ve H) duyarlılıklarının karşılaştırılması. (*); LAMP yöntemi ile çoğaltılan ürünlerin syber green (Invitrogen™) ile görüntülenmesi.

Image 1. (A); LAMP performed using CYTOB1 primers with template DNA from different isolates of *T. annulata* and other *Theileria*, *Babesia* and *Anaplasma* species. Lane 1: 100 bp molecular size marker (Invitrogen™); 2: empty; 3-12: Tunisian, Iran, Umbanein, Gharb, Israel, Akçaova, Dalama, Pendik, Aydın and Diyarbakır isolates of *T. annulata*; 13: BL20; 14: uninfected bovine PBM; 15: *T. parva*; 16: *T. sergenti*; 17: *T. lestoquardi*; 18: *B. bovis*; 19: *B. bigemina*; 20: *T. equi*; 21: *A. marginale*; 22: *A. centrale*; 23: *A. phagocytophila*; 24: water; 25: empty; 26: 100 bp molecular size marker (Invitrogen™). (B and C); Determination of the sensitivity of LAMP performed using CYTOB1 primer pairs to amplify cytochrome b gene of *T. annulata* (B) and PCR performed by F3/B3 primer set (C) using 10-fold serial dilutions of *T. annulata* DNA. Lane 1: 100 bp molecular size marker (Invitrogen™); 2-10: ten-fold dilution series of *T. annulata* Ankara/D7 DNA ranging from 200 nanogram to 2 femtogram.

(D); LAMP of rhoptri protein-1 gene of *B. bovis* using primers determined by Iseki et al. (10). Lane 1: 100 bp molecular size marker (Invitrogen™); 2: empty; 3-11: different isolates of *B. bovis* (Meksiko, Kusanyangwa, M07, Lismore, Kuwanyga, Israel field strain I, Israel field strain II, Israel vaccine strain I, Israel vaccine strain II); 12: uninfected ovine PBM; 13: water; 14: Aydın strain of *B. bovis*.

(E - H); Comparison of sensitivities detected by CYTOB1 primer pairs used to amplify cytochrome b gene of *T. annulata* with LAMP method (E and F) and PCR with F3/B3 primers (G and H) using 10-fold serial dilutions (10^{-1} - 10^{-10}) of DNA samples isolated from piroplasm (C9) ve macroschizont cell line (D7), respectively. (*); visualization of products amplified using LAMP reaction after straining with syber green (Invitrogen™).

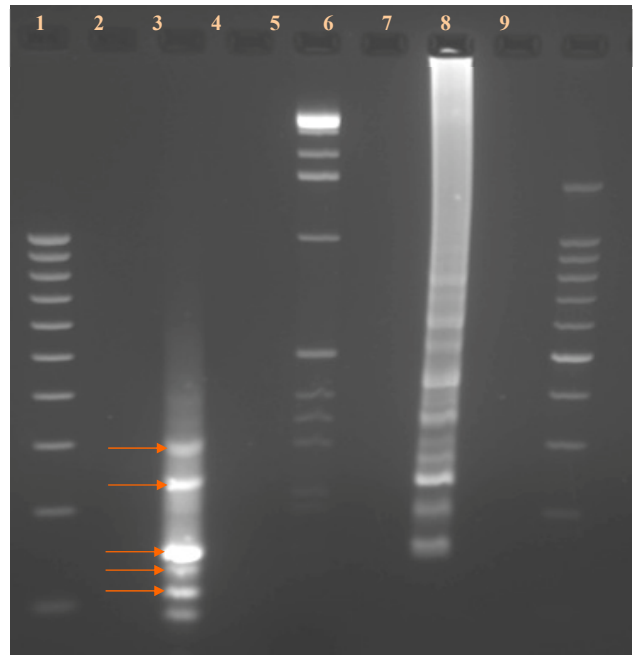
Sekans analiz sonuçları ve LAMP ürünlerinin *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanılarak kesilmesi: LAMP yöntemi ile F3/B3 dış primerlerinin çoğalttığı hedef DNA bölgesinin *T. annulata*'nın farklı izolatları (Ankara/D7, Dalama, Diyarbakır, Akçaova, Aydın ve Pendik) arasında herhangi bir farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla yapılan sekans analiz sonuçları incelendiğinde F3/B3 ve FIP ile BIP (B1c hariç) bölgelerinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 1A). BIP primerine ait B1c bölgesinde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) gözlenmiş ve bu polimorfik nükleotidler primerin ilgili bölgeye bağlanmasında herhangi bir farklılığa yol açmamaktadır. Bunun yanında, LAMP yönteminde çoğaltılan hedef DNA bölgesinin doğrulanması amacıyla *T. annulata*'nın C9 piroplasm ve D7 makroşizont DNA'ları kullanılarak F3/B3 PZR ile çoğaltılan 185 bp'lık bölgenin sekansının clustal X bilgisayar programı kullanılarak yapılan karşılaştırmasında piroplasm ve makroşizont dönemlerinde sitokrom b genine ait 185 bp'lık iki bölge de herhangi bir polimorfizm görülmemiştir (Şekil 1B). NCBI veri tabanında kayıtlı gen bölgeleri ile yapılan karşılaştırma sonucunda 185 bp'lık dizilim analiz sonuçları ile veri tabanında kayıtlı sitokrom b genine ait aynı bölge arasında % 100 benzerlik gözlemiştir. Çoğaltılan LAMP ürünlerinin *EcoRI* enzimi ile kesilmesi sonrası oluşan bantlar incelenmiş ve yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla 301 bp, 271 bp, 158 bp, 143 bp, 114 bp'lık toplam beş bant gözlenmiştir (Resim 2). Bunlarda 271, 185 ve 114 bp'lık bölgeler beklenen bantlar olmasına karşın, oluşan diğer iki bant (301 ve 143) daha önce yapılan analizlerde belirlenememiş bantlardır. Bunların restriksiyon esnasında hedef DNA miktarının fazla olmasından kaynaklı özgül olmayan bantlar olduğu düşünülmektedir.

PZR ve LAMP yönteminin duyarlılıklarının karşılaştırılması: CYTOB1 ve CYTOB341 primerleri ile yapılan LAMP ve dış F3/B3 primer çiftleri ile cyto b1 primer çiftleri (6) kullanılarak yapılan PZR deneysel enfekte buzağıdan elde edilen sulandırılmalardan ekstrakte edilen DNA örnekleri ile elde edilen sonuçlar Tablo 2' de verilmiştir. Ayrıca, deneysel enfekte buzağıdan elde edilen sulandırılmaların FTA kartlarından üzerine damlatılması ile hazırlanan kartlardan ekstrakte edilen DNA örnekleri ile D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan sulandırmalardan elde edilen DNA örnekleri kullanılarak elde edilen duyarlılıklar Tablo 2' de verilmiştir.

LAMP reaksiyonu üzerine inhibitörlerin etkisi: LAMP ile PZR'nin duyarlılıkları üzerine biyolojik bileşenler ile ortamda bulunan parazite ait başlangıç DNA miktarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla eşit konsantrasyonlardaki *T. annulata*'ya ait C9 piroplasm ve D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan DNA'ların 10 katlı dilüsyonlarında sitokrom b genini LAMP yöntemi ile çoğaltmakta kullanılan CYTOB1 primer çiftleri ve PZR

yöntemi ile çoğaltmakta kullanılan F3/B3 primer çiftlerinin duyarlılıkları Tablo 2' de verilmiştir.

LAMP yönteminin saha şartlarında kullanılabilirliği: LAMP yönteminin saha şartlarında denenmesi amacıyla tropikal theileriosis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerden toplanan toplam 52 kan örneğinden hazırlanan DNA örneklerinin CYTOB1 LAMP ve cyto b1 PZR ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Cyto b1 PZR toplanan 52 örnekten 51 tanesi *T. annulata* için pozitif sonuç verirken, CYTOB1 primerleri kullanılarak yapılan LAMP testi sonucunda toplanan 52 örnekten sadece 28 tanesi pozitif, kalan diğer 24 örnekte ise negatif sonuç vermiştir.



Resim 2. LAMP ürünlerinin *EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra yapılan agaroz jel % 2 elektroforez görüntüsü. Kuyu 1 ve 9: 100 bp'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); 5: 1 kb'lık moleküler boyut belirleyici (Invitrogen™); 2, 4, 6 ve 8: boş; 3: LAMP ürününün *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra oluşan yukarıdan aşağıya sırasıyla; 301-271-158-143 ve 114 bp'lık bantlar; 7: *EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş olan LAMP ürününü göstermektedir. Image 2. Agarose gel (2%) electrophoresis of LAMP products digested with *EcoRI* (New England Biolabs, UK) restriction enzyme. Lanes 1 and 9: 100 bp molecular size marker (Invitrogen™); lane 5: 1 kb molecular size marker (Invitrogen™); 2, 4, 6 and 8: empty; 3: 301-271-158-143 and 114 bp LAMP products digested with *EcoRI* from top to bottom, respectively; 7: undigested LAMP product.

Tartışma ve Sonuç

Biyoteknoloji alanında yaşanan yenilikler nükleik asit çoğaltma teknikleri hastalık etkenlerinin belirlenmesinde rutin laboratuvar teknikleri ve modelleri haline getirmiştir (7). Son yıllarda termal siklusa ihtiyaç duymadan izotermal koşullar altında hedef bölgelerin çoğaltılmasına olanak sağlayan yeni nesil gen çoğaltma

tekniklerinden biri olan LAMP hedef DNA'yı kısa zamanda çoğaltabilen ve elde edilen ürünün kolay ve hızlı tespitine olanak veren bir yöntem olarak (7, 22, 26) diğer nükleik asit çoğaltma yöntemlerine göre daha avantajlı bir konuma getirmiştir. LAMP yönteminde hedef organizmaların DNA'ları yüksek özgüllükte çoğaltılabilmektedir.

T. annulata'ya ait *SVSP* geni (28) ile *T. annulata*'nın 18S rRNA ve ITS gen bölgelerine özgü primerlerin (15) ve *T. parva*'nın tek kopyalı PIM ve p150 gen bölgelerine özgü primerlerin (30) farklı bölgelere ait izolatları özgül olarak çoğaltılabilmektedir. Bu çalışmada, *T. annulata*'nın LAMP yöntemi ile tespiti amacıyla CYTOB1 ile CYTOB341 primer çiftlerinin *T. annulata*'nın farklı izolatlarını çoğalttığı, BL20 ve diğer türlere ait DNA'larda herhangi bir çoğalma olmadığı belirlenmiştir (Resim 1A). Bu çalışmada, kullanılan diğer gen bölgelerini çoğaltan sırasıyla Mero21, 25, 26, Tams417 ve CYTOB288 pimer çiftlerinden herhangi bir ürün elde edilememiş, bunun yanında Tams416, 898 primer çiftleri *T. annulata*'nın Tunus, Umbanein, Akçaova ve Dalama izolatlarını özgül olarak çoğaltamamıştır (Tablo 2). Yapılan çalışmalarda, *T. parva*'nın LAMP yöntemi ile belirlenmesinde kullanılan p67 ile 18S primer çiftleri de sadece belli izolatlarda çoğalma sağlayabilmiştir (30). Bunun yanında, HSP70 genine özgü tasarlanan primerlerin *T. annulata*/*T. parva*/*T. mutans* ve *T. taurotragi* etkenlerinin eş zamanlı tespitinde kullanılabilecek universal bir primer olduğu belirtilmiştir (30). Diğer taraftan, Iseki ve ark. (10) tarafından *B. bovis*'in LAMP yöntemi ile teşhisinde kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftlerini kullanarak yaptığımız testlerde, farklı coğrafik bölgelere ait dokuz izolatin tümünü aynı özgüllükte çoğaltamaması (Resim 1D) LAMP yönteminde kullanılan primer çiftlerinin tasarlanmasında ve reaksiyonun optimizasyonunda dikkate alınması gereken birçok bilinmeyen değişken olduğunu ve bunların ileride yapılacak çalışmalar ile değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Saha şartlarında kullanılacak bir testte aranılan bir diğer önemli özellikte tespit edilmesi planlanan organizmayı hangi düzeyde ya da bir diğer deyimle hangi duyarlılıkta tespit edebildiğidir. LAMP'ın duyarlılığının belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem, reaksiyonda kullanılan dış primer çiftleri (F3/B3) ile yapılan PZR'de elde edilen sonuçların LAMP ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmasıdır. Ancak, bu yolla belirlenen duyarlılıklar kullanılan hedef DNA bölgesi, primer çiftleri, reaksiyon koşulları ve ortamda bulunan hedef DNA miktarına bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. LAMP'ın, *Trypanosoma brucei gambiense*'nin mikroskopik ve PZR metotlarıyla teşhisine (13), *T. equi* (32) ve sığır babesiosis (10) ile koyunlarda hastalık oluşturan *Theileria* ve *Babesia* soyundaki kan parazitlerinin (8, 27) belirlenmesinde PZR'ye göre, *B. gibsoni*'nin tespitinde (17) ise nested PZR'ye göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında,

köpeklerde görülen *B. gibsoni*'nin (9) ve equine piroplazmosis etkenlerinin tespitinde kullanılan LAMP yöntemi (3) ile PZR eşit duyarlılıkta hastalık etkenlerini tespit edebilmiştir. Yine köpeklerde görülen *B. canis*'in tespitinde LAMP yöntemine göre PZR'nin daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (19). *T. annulata*'ya ait *SVSP* genine özgü primerler kullanılarak yapılan LAMP'ın PZR'ye oranla 10 kat daha duyarlı olduğu ve 10 pg'a kadar parazit DNA'sını tespit edebildiği belirlenmiştir (28). *T. annulata*'nın 18S rRNA ve ITS gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak yapılan LAMP reaksiyonlarının 0.1 pg *T. annulata* DNA'sını duyarlı olarak tespit edebildiğini, bunun yanında ilgili gen bölgelerine ait F3/B3 dış primerleri ile yapılan PZR'lerin duyarlılıklarının ise 10 pg'a kadar düştüğü bildirilmiştir (15). Bu çalışmada, CYTOB1 ve CYTOB341 primerleri ile yapılan LAMP reaksiyonu aynı gen bölgesini PZR ile çoğaltan F3/B3 primer çifti ile elde edilen duyarlılık ile aynı bulunmuş (10^{-2}), ancak aynı genin 312 bp'lık bölgesini PZR ile çoğaltan cyto1 primer çiftinden (6) 10^2 kat daha az duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, D7 makroşizont hücre kültüründen hazırlanan sulandırılmalarda CYTOB1 LAMP ve F3/B3 PZR'nin her ikisinde 2 fg parazit DNA'sını tespit edebilmekte (Resim 1B ve C) ve *SVSP* genine oranla (10 pg) 10^4 kez daha duyarlı olduğu görülmektedir. Ancak, CYTOB341 primerleri ile yapılan LAMP D7 dilüsyonlarında 10 kat daha az duyarlılık (10^{-8}) göstermiştir. Salih ve ark. (28) tarafından belirtilenin aksine LAMP PZR'ye oranla 10 kez daha duyarlı olmayıp eşit duyarlılık göstermiştir. Bir diğer çalışmada ise; *T. parva*'nın LAMP yöntemi ile tespitinde kullanılan tek kopyalı PIM ve p150 gen bölgelerine özgü primerlerin duyarlılığının 1 fg olduğu, P104 primer çiftlerinin ise PZR'ye oranla duyarlılığının daha düşük olduğu bildirilmiş ve saha şartlarında testin duyarlılığının değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (30).

Trypanosoma türlerinde (22, 23, 24) olduğu gibi *T. annulata*'da (15) da belli bir miktardan (>200 ng) daha yoğun DNA içeren örnekler LAMP üzerine inhibitör etkisi yaparak agaroz jelde zayıf bantların görülmesine neden olabilmektedir. Reaksiyonda kullanılan DNA miktarının 100 ng'a kadar düşürülmesinin LAMP yöntemi ile ürünlerin çoğaltılmasını sağladığı belirtilmiştir (15). Benzer şekilde bu çalışmada, LAMP testi sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde bazı saha örneklerinin çok zayıf pozitiflik gösterdiği belirlenirken (veri gösterilmemiştir), tekli PZR testleri ile aynı saha örnekleri daha güçlü pozitiflik vermiştir. Bu çalışmada, CYTOB1 LAMP ile 400 ng'a kadar saflaştırılmış piroplazmlardan elde edilen DNA'lar başarı ile çoğaltılmış ve daha önceki bildirimlerin aksine reaksiyonda başlangıç hedef DNA miktarı arttıkça testin duyarlılığında arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, CYTOB1 LAMP yöntemi saflaştırılmış piroplazm DNA'larını, D7 hücre kültürü DNA dilüsyonlarına oranla 10^5 kez daha duyarlı olarak tespit edebilmiştir. Aynı dilüsyonlar ile

F3/B3 primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonuçları ile LAMP sonuçları paralellik göstermiştir (Resim 1E-H). LAMP yöntemi ile 25-37°C'de saklanan DNA örneklerinde *Trypanosoma* DNA'ları çoğaltılabilmekte ve farklı derecelerde (-20°C, 25°C ve 37°C) saklanan reaksiyon solüsyonların etkinliğinde istatistiksel olarak bir fark oluşmamaktadır (30). LAMP yönteminin kültür vasatına ve bazı biyolojik bileşenlere karşı tolerans gösterdiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (11). Ancak bu çalışmada, yapılan analizler sonucunda DNA miktarından ziyade LAMP reaksiyonu üzerine *in vitro* hücre kültüründe yer alan bazı biyolojik inhibitörlerin etkili olabileceğini akla getirmektedir. Bununla birlikte, duyarlılığın göreceli olarak az olmasının *in vitro* hücre kültüründeki başlangıç hedef DNA miktarının az olmasından kaynaklanma olasılığı göz ardı edilmemelidir. *In vitro* hücre kültüründe yer alan biyolojik inhibitörlerin, LAMP reaksiyonu üzerine olan etkisi ileride yapılacak çalışmalar ile değerlendirilmesi faydalı olacaktır. Önceki çalışmalarda, LAMP'ın etkinliğinin en iyi genomik DNA ile elde edildiği (%100), bunun yanında filtre kartları (%78), ham kan (%72) ve hemoliz edilmiş kan (%51) kullanılarak yapılan denemelerde LAMP'ın etkinliğinin ortamda bulunabilecek yüksek konsantrasyondaki (1 mg/ml) EDTA ve heparin gibi inhibitörlerin reaksiyonu olumsuz etkilediği ve testin verimliliğini azalttığı belirtilmiştir (30). Bu çalışmada FTA kartlarından izole edilen DNA'larla yapılan denemede hem CYTOB1 ve CYTOB341 primerleri ile yapılan LAMP ve hem de F3/B3 primerleri ile yapılan PZR'lerde herhangi bir ürün elde edilememiştir. Yapılan deneysel enfeksiyon esnasındaki düşük parazitemi seviyesine (%0.1) sahip kanın enfekte olmayan kan ile sulandırılması ve buna bağlı olarak FTA kartlarından izole edilen çok düşük miktardaki DNA ile ortamda bulunan yüksek konsantrasyondaki EDTA ve/veya heparine bağlı olarak hem PZR hem LAMP yönteminde ürün elde edilememiş olma olasılığı oldukça yüksektir.

LAMP yönteminin saha şartlarında kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla bu çalışmada saha şartlarından toplanan toplam 52 kan örneği ile yapılan değerlendirmelerde CYTOB1 primerleri kullanılarak yapılan LAMP testi ile PZR'ye oranla yaklaşık olarak %50 daha az pozitiflik gözlenmiştir. LAMP yönteminin *T. equi*'nin saha örnekleri ve kenelerde tespitinde normal PZR ile aynı özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir (32). LAMP yöntemi ile saha şartlarında toplanan örneklerin tespiti referans yöntemlere göre farklılıklar gösterebilmekte ve kimi negatif örnekler LAMP ile pozitif olarak belirlenirken, pozitif örnekler ise negatif sonuç verebilmektedir (19). *B. gibsoni*'nin saha şartlarında toplanan örneklerinde LAMP yöntemi ile nested PZR ve mikroskopik incelemelere oranla daha fazla sayıda örnekte pozitiflik belirlenmiştir (17). Sudan'da toplanan 61 saha örneğinde

RLB (reverse line blotting) ile 38 (%62.3), LAMP yöntemiyle 37 (%60.7) örnek *T. annulata* yönünden pozitif olarak bulunmuştur (28). Her ne kadar her iki yöntemde de birbirine yakın sonuçlar elde edilmiş gibi görünse de RLB ile pozitiflik tespit edilen 14 örnek, LAMP ile negatif bulunmuştur (28).

Sonuç olarak, LAMP tekniği saha şartlarında kullanılabilir ve yüksek özgüllükte bir test olmakla birlikte, sitokrom b genini çoğaltmada kullanılan CYTOB1 primerleri ile saha şartlarından toplanan örneklerde elde edilen sonuçlara göre *T. annulata*'nın tespitinde LAMP'ın duyarlılığının PZR'ye oranla oldukça düşük olduğunu göstermiştir. Ancak LAMP'ın son yıllarda geliştirilmeye başlayan yeni bir nükleik asit çoğaltma yöntemi olması ve ileride yapılacak çalışmalarda kullanılabilir farklı gen bölgeleri ve optimize edilecek koşullar ile duyarlılığının artırılarak saha şartlarına uygun bir yöntem haline gelebileceği göz ardı edilmemelidir.

Kaynaklar

1. **Adaszek L, Jankowska M, Kalinowski M ve ark.** (2013): *The loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of Babesia canis canis infections in dogs*. Pol J Vet Sci, **16**, 131-3.
2. **Alhassan A, Govind Y, Tam NT ve ark.** (2007): *Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis*. Parasitol Res, **100**, 1165-1168.
3. **Alhassan A, Thekisoe OM, Yokoyama N ve ark.** (2007): *Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis*. Vet Parasitol, **143**, 155-160.
4. **Aonuma H, Suzuki M, Iseki H ve ark.** (2008): *Rapid identification of Plasmodium carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification*. Biochem Biophys Res Commun, **376**, 671-676.
5. **Bakheit MA, Torra D, Palomino LA ve ark.** (2008): *Sensitive and specific detection of Cryptosporidium species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing*. Vet Parasitol, **158**, 11-22.
6. **Bilgic HB, Karagenc T, Shiels B ve ark.** (2010): *Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR based detection of T.annulata carrier animals*. Vet Parasitol, **174**, 341-347.
7. **Gill P, Ghaemi A** (2008): *Nucleic acid isothermal amplification Technologies-a review*. Nucleos Nucleot Nucl, **27**, 224-243.
8. **Guan G, Chauvin A, Luo J ve ark.** (2008): *The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of Babesia spp. infective to sheep and goats in China*. Exp Parasitol, **120**, 39-44.
9. **Ikadai H, Tanaka H, Shibahara N ve ark.** (2004): *Molecular evidence of infections with Babesia gibsoni parasites in Japan and evaluation of the diagnostic*

- potential of a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol*, **42**, 2465-2469.
10. **Iseki H, Alhassan A, Ohta N ve ark.** (2007): Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Methods*, **71**, 281-287.
 11. **Kaneko H, Kawana T, Fukushima E ve ark.** (2007): Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*, **70**, 499-501.
 12. **Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K ve ark.** (2007): Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of cryptosporidium oocysts in fecal and water samples. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 5660-5662.
 13. **Kuboki N, Inoue N, Sakurai T ve ark.** (2003): Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J Clin Microbiol*, **41**, 5517-5524.
 14. **Liu A, Guan G, Du P ve ark.** (2012): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Int*, **61**, 658-63.
 15. **Liu A, Guan G, Du P ve ark.** (2012): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of *Theileria annulata* infection in China targeting the 18S rRNA and ITS sequences. *Exp Parasitol*, **131**, 125-129.
 16. **Liu Z, Hou J, Bakheit MA ve ark.** (2008): Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of ovine theileriosis in China. *Parasitol Res*, **103**, 1407-1412.
 17. **Mandal M, Banerjee PS, Kumar S ve ark.** (2015): Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Vet Parasitol*, **209**, 50-55.
 18. **Mori Y, Nagamine K, Tomita N ve ark.** (2001): Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 150-154.
 19. **Müller H, Aysul N, Liu Z ve ark.** (2010): Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of *Babesia canis* infections. *Transbound Emerg Dis*, **57**, 63-65.
 20. **Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K ve ark.** (2001): Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem*, **47**, 1742-1743.
 21. **Notomi T, Okayama H, Masubuchi H ve ark.** (2000): Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, **15**, 28(12): E63.
 22. **Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E ve ark.** (2008): African trypanosomiasis: Sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int J Parasitol*, **38**, 589-599.
 23. **Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T ve ark.** (2008): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**, e147.
 24. **Nyimba PH, Komba EV, Sugimoto C ve ark.** (2015): Prevalence and species distribution of caprine trypanosomosis in Sinazongwe and Kalomo districts of Zambia. *Vet Parasitol*, **210**, 125-130.
 25. **Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK ve ark.** (2008): Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol*, **18**, 407-421.
 26. **Plutzer J, Karanis P** (2009): Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol Res*, **104**, 1527-1533.
 27. **Salih DA, Ali AM, Liu Z ve ark.** (2012): Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Theileria lestoquardi*. *Parasitol Res*, **110**, 533-538.
 28. **Salih DA, Liu Z, Bakheit MA ve ark.** (2008): Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis. *Transbound Emerg Dis*, **55**, 238-243.
 29. **Thekisoe OM, Bazie RS, Coronel-Servian AM ve ark.** (2009): Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. *J Vet Med Sci*, **71**, 471-475.
 30. **Thekisoe OM, Rambritch NE, Nakao R ve ark.** (2010): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes. *Int J Parasitol*, **40**, 55-61.
 31. **Tomita N, Mori Y, Kanda H ve ark.** (2008): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*, **3**, 877-882.
 32. **Xie J, Liu G, Tian Z ve ark.** (2013): Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Theileria equi*. *Acta Trop*, **127**, 245-250.

Geliş tarihi: 28.09.2015 / Kabul tarihi: 13.10.2016

Yazışma adresi:

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Bilgin Bilgiç
Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı
09100 Işıklı/Aydın
e-mail: hbilgic@adu.edu.tr