

Theileria annulata ve *Theileria buffeli*'nin Teşhisinde Multiplex PCR'ın Kullanılması

Kürşat ALTAY, Mehmet Fatih AYDIN, Uğur ULUIŞIK, Münir AKTAŞ, Nazir DUMANLI

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET: Türkiye'de sığırlarda *Theileria annulata* ve *T. buffeli* türleri bulunmaktadır. Bunlardan *T. annulata* yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden tropikal theileriosisin etkenidir. *T. buffeli* ise düşük patojeniteli ya da apatojen tür olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada *T. annulata* ve *T. buffeli*'nin eş zamanlı teşhisi amacıyla multiplex PCR metodu uygulandı. PCR ile *T. annulata*'nın merozoit yüzey antijen (Tams 1), *T. buffeli*'nin major piroplasm yüzey protein (MPSP) genleri eş zamanlı olarak amplifiye edildi. Multiplex PCR ile bu iki türden sadece biriyle oluşan enfeksiyonların yanı sıra, miks enfeksiyonların da belirlenebileceği ortaya konuldu.

Anahtar kelimeler: *Theileria annulata*, *Theileria buffeli*, multiplex PCR.

Use of Multiplex PCR for the Diagnosis of *Theileria annulata* and *Theileria buffeli*

SUMMARY: The species causing theileriosis in cattle in Turkey are *Theileria annulata* and *T. buffeli*. While *T. buffeli* is low in pathogenicity or non-pathogenic, *T. annulata* is very pathogenic and causes tropical theileriosis with high morbidity and mortality in cattle. In this study, a multiplex PCR was used for a simultaneous diagnosis of these species. Genes for the merozoite surface antigen (Tams 1) and the major piroplasm surface protein (MPSP) were amplified with PCR for *T. annulata* and *T. buffeli*, respectively. It was found that both single and mixed infection with *T. annulata* and *T. buffeli* could be diagnosed with multiplex PCR.

Key words: *Theileria annulata*, *Theileria buffeli*, multiplex PCR.

GİRİŞ

Türkiye'de sığırlarda *Theileria annulata* ve *T. buffeli* türlerinin varlığı bilinmektedir. Bunlardan *T. annulata* yüksek morbidite ve mortaliteye sahip bir hastalık olan tropikal theileriosisin etkenidir. *T. buffeli*'nin ise apatojen ya da düşük patojeniteli bir tür olduğu ifade edilmektedir (2, 11, 16, 17).

Theileriosisin teşhisi, akut vakalarda klinik bulgular ve Giemsa ile boyanmış kan ve lenf yumrusu frotilerinin mikroskopik muayenesiyle yapılırken, latent enfeksiyonların saptanmasında uzun süre serolojik yöntemler kullanılmıştır. Özellikle subklinik enfeksiyonlarda sürme kan frotilerinde eritrositler içindeki piroplasmaların tespiti oldukça zor ve zaman alıcıdır. Ayrıca, *Theileria* türlerinin morfolojik yapıları benzer olduğundan mikroskopik muayene ile tür ayrımı yapılamamaktadır. Serolojik testlerde ise çapraz reaksiyonlar yanlış negatif ve pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (8). Son yıllarda theileriosisin teşhisinde direk parazit DNA'sının saptanmasına yönelik yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip polimeraz zincir

reaksiyonu (PCR) ve reverse line blotting (RLB) gibi çeşitli moleküler teşhis metotları uygulanmaktadır (4, 6, 7, 11, 13, 17).

Theileria annulata ve *Theileria buffeli*'nin teşhisine yönelik PCR metotları geliştirilmiştir (13, 15). Ancak geleneksel PCR ile tek bir türün teşhisi mümkün olmaktadır. Birden çok türün eş zamanlı teşhisini mümkün kılan, PCR ile hibridizasyonun birleştirildiği bir moleküler teşhis metodu olan RLB ise PCR'dan daha fazla zaman ve maliyet gerektirmektedir (14).

Bu çalışmada Türkiye'de sığırlarda varlığı bilinen *Theileria* türlerinin (*T. annulata*, *T. buffeli*) eş zamanlı teşhisinde multiplex PCR metodunun kullanılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada *T. annulata* ve *T. buffeli*'nin eş zamanlı teşhisi amacıyla multiplex PCR metodu uygulanmıştır.

Pozitif ve Negatif Kontroller: *T. annulata* için pozitif kontrol olarak, daha önce tarafımızdan yapılan çalışmada (3) sekans analizi (AY508463) ile tanımlanmış ve stoklarımızda mevcut olan DNA örneği kullanılmıştır. *T. buffeli*'ye ait pozitif kontrol DNA örneği ise Dr. Sonia Almeria de la Merced'den (Department of Parasitology, Veterinary School, Autonomous University of Barcelona, Spain) sağlanmıştır. *T. annulata* ve *T. buffeli* miks enfeksiyonları için pozitif kontrol, her iki türe ait pozitif örneklerden eşit miktarlarda kullanılarak oluşturulmuştur.

Makale türü/Article Type: **Araştırma/Original Research**

Geliş tarihi/Submission date: 02 Temmuz/02 July 2007

Düzeltilme tarihi/Revision date: -

Kabul tarihi/Accepted date: 13 Ağustos/13 August 2007

Yazışma /Corresponding Author: Kürşat Altay

Tel: (+90) (424) 237 00 00 Fax: (+90) (424) 238 81 73

E-mail: kaltay@firat.edu.tr

Negatif kontrol DNA örneği elde etmek için, 1 aylık buzağıdan kan alınmış ve bu kandan Clausen ve ark.'nın (9) belirttiği şekilde DNA ekstrakte edilmiştir. Bu DNA, Allsopp ve ark. (5) tarafından geliştirilen ve bütün *Theileria* türlerini çoğaltan 989 (5'-AGTTTCTGACCTATCAG-3') ve 990 (5'-TTGCCTTAAACTTCCT TG-3') primerleri kullanılarak PCR'da amplifikasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon sonucunda, *Theileria* türlerinin varlığını gösterecek herhangi bir amplifikasyon ürünü oluşmamıştır. Böylece bu örneğin, *Theileria* parazitleri yönünden ari olduğu kabul edilmiş ve PCR testinde negatif kontrol DNA örneği olarak kullanılmıştır.

Multiplex PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu *T. annulata* ve *T. buffeli*'ye spesifik toplam iki çift primer kullanılarak yapılmıştır. Bu primerlerin amplifiye ettiği gen bölgeleri ve spesifi-teleri Tablo 1'de verilmiştir. *T. annulata* spesifik primerlerin (Tams 1F/Tspm 1R) parazitin Tams 1 genini, *T. buffeli* spesifik primerlerin (Ts-U/Ts-R) parazitin MPSP genini amplifiye ettiği daha önce sırasıyla Kirvar ve ark. (13) ve Tanaka ve ark. (15) tarafından yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur.

Theileria annulata Tams 1 ve *T. buffeli* MPSP gen spesifik primelerle yapılan multiplex PCR, 50 µl toplam hacimde [5 µl 10 x PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH 9), 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 5 mM MgCl₂, 250 µM her bir deoxynucleotide triphosphates, 1.7 U Taq DNA polymerase (MBI Fermentas, Lithuania), 2,5 µl (20 pm/µl) her bir primerden, ve 5 µl template DNA] gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şartları 94 °C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 37 siklus 94 °C'de 1 dk, 60 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 2 dk'dan oluşmuştur. Ayrıca 72 °C'de 10 dk'lık bir son uzatma eklenmiştir. Oluşan ürünler %1,8'lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı izlenmiştir.

Multiplex PCR metodunun *T. annulata* ve *T. buffeli* ile oluşan miks enfeksiyonları da tespit edebileceğini göstermek amacıyla, pozitif kontrollerin her birinden 2,5 µl kullanılarak PCR yapılmıştır.

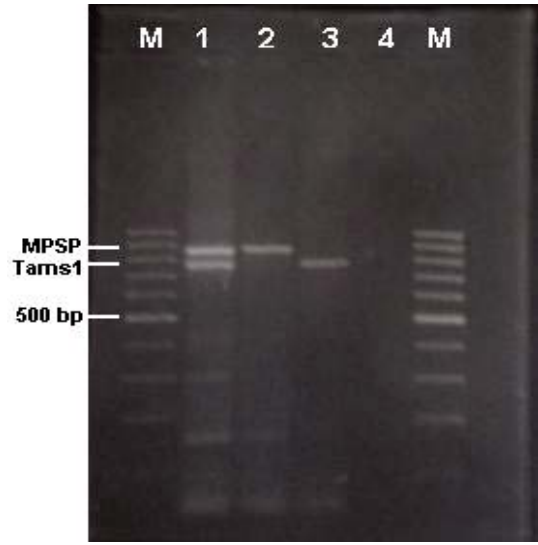
BULGULAR

Theileria annulata Tams 1 geni (Tams 1F/Tspm 1R) ve *T. buffeli* MPSP geni (Ts-U/Ts-R) spesifik primeler kullanılarak yapılan multiplex PCR ile elde edilen ürünlerin ethidium bromide ile boyalı agaroz jel elektroforezde görünümü Şekil 1'de verilmiştir.

Şekil 1'de de görüldüğü gibi *T. annulata* ve *T. buffeli*'ye ait pozitif kontrol DNA'lar kullanılarak yapılan multiplex PCR sonucunda sırasıyla Tams 1 geni ve MPSP geni amplifiye edilmiştir. Bu pozitif kontroller kullanılarak oluşturulan mix template ile de her iki gen amplifiye edilebilmiştir. Böylece multiplex PCR ile gerek tek ve gerekse miks enfeksiyonların belirlenebileceği ortaya konmuştur.

Tablo 1. Multiplex PCR'da kullanılan primerler ve özellikleri.

Gen ve Primer	Primer DNA dizilimi (5'-3')	Spesifite	Kaynak
Tams 1			
Tams 1F	ATGCTGCAAATGAGGAT	<i>T. annulata</i>	13
Tspm 1R	GGACTGATGAGAAGACGATGAG		
MPSP			
Ts-U	CACGCTATGTTGTCCAAGAG	<i>T. sergenti/ buffeli/ orientalis</i>	15
Ts-R	TGTGAGACTCAATGCGCCTA		



Şekil 1. Tams 1F/Tspm 1R, Ts-U/Ts-R primeleri, *T. annulata* ve *T. buffeli*'ye ait pozitif kontrol DNA'ları kullanılarak yapılan multiplex PCR sonucunda elde edilen ürünlerin ethidium bromide ile boyalı agaroz jel elektroforezde görünümü. M: marker (100 bp'lik), 1. *T. annulata* + *T. buffeli*, 2. *T. buffeli*, 3. *T. annulata*, 4. Negatif kontrol.

TARTIŞMA

Moleküler biyolojideki gelişmeler, yüksek spesifite ve sensitifiteye sahip yeni teşhis metodlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Moleküler teşhis metodlarının parazitoloji alanında da uygulanması gecikmemiş, başta PCR olmak üzere, çeşitli moleküler metodların parazitolojide uygulanması ile çok sayıda türün kesin teşhisi mümkün olmuş, hatta yeni türlerin varlığı ortaya konmuştur (1, 2, 6, 11, 17). Çin'de koyun ve keçilerde bilinen *Theileria* türlerinden farklı bir *Theileria* türü bulunmuş (1), Türkiye'de sığırlarda *T. buffeli* (2, 11, 17) ile koyun ve keçilerde *Theileria* sp. MK adı verilen yeni bir *Theileria* izolatu saptanmıştır (6).

Theileria türlerinin teşhisinde Polimeraz Zincir Reaksiyonunun kullanılmasına yönelik yapılan çalışmalar sayesinde (7, 13, 15), özellikle taşıyıcı hayvanlarda *Theileria* türlerinin duyarlı ve özgül biçimde teşhisleri sağlanmıştır. Bu bağlamda Altay ve ark. (7) *T. ovis*' in, Kirvar ve ark. (1) *T. annulata*'nın ve Tanaka ve ark. (15) *T. sergenti/buffeli/orientalis*'in teşhisine

yönelik PCR metodunu geliştirerek uygulamışlardır. Bu yöntemle türlerin teşhisi güvenli bir şekilde yapılmakla birlikte, her türün belirlenmesi için ayrı test uygulanması gerektirmektedir. Bu çalışmada, *T.annulata* ve *T.sergenti/buffeli/orientalis* türlerinin eş zamanlı olarak teşhisinde kullanılacak multiplex PCR metodu uygulanmıştır. Multiplex PCR’ da kullanılan primerlerin (Tams 1F/Tspm 1R ve Ts-U/Ts-R) spesifiteleri daha önce Kirvar ve ark. (13) ile Tanaka ve ark. (15) tarafından belirlenmiş ve sırası ile *T. annulata* ve *T.sergenti/buffeli/orientalis* parazitlerinin Tams 1 ve MPSP genlerini amplifiye ettikleri saptanmıştır. Bu çalışmada uygulanan multiplex PCR ile *T.annulata* ve *T.buffeli*’ den ileri gelen gerek tek ve gerekse mikse enfeksiyonların belirlenebileceği ortaya konmuştur.

Son yıllarda, Türkiye’nin değişik bölgelerinde sığırlarda *T. annulata* ve *T. buffeli/orientalis* türlerinin bulunduğu PCR ve RLB metodları kullanılarak yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (2, 10, 12, 17). Bu çalışmada uygulanan multiplex PCR ile *T. annulata* ve *T. buffeli*’nin eş zamanlı olarak teşhisinin mümkün olduğu belirlenmiş, bu metodun özellikle epidemiyolojik çalışmalarda güvenle kullanılabilmesi ve zaman yönünden önemli tasarruf sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Theileria buffeli pozitif kontrol DNA örneğini gönderen Dr. Sonia Almeria de la Merced’e (Department of Parasitology, Veterinary School, Autonomous University of Barcelona, Spain) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Ahmed JS, Luo J, Schnittger L, Seitzer U, Jongejan F, Yin H, 2006. Phylogenetic position of small ruminant infecting piroplasm. *Ann NY Acad Sci*, 1081: 498-504.
2. Aktas M, Altay K, Dumanli N, 2006. A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 138: 179-185.
3. Aktas M, Bendele KG, Altay K, Dumanli N, Tsuji M, Holman PJ, 2007. Sequence polymorphism in the ribosomal DNA internal transcribed spacers differs among *Theileria* species. *Vet Parasitol*, 147(3-4): 221-230.
4. Aktas M, Dumanli N, Cetinkaya B, Cakmak A, 2002. Field evaluation of PCR in detecting *Theileria annulata* infection in cattle in eastern Turkey. *Vet Rec*, 150:548-549.
5. Allsopp BA, Baylis HA, Allsopp MTEP, Cavalier-Smith T, Bishop RP, Carrington DM, Sopanpal B, Spooner P, 1993. Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitology*, 107:157-165.
6. Altay K, Dumanli N, Aktas M. 2007. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet. Parasitol*, 147:161-165.
7. Altay K, Dumanli N, Holman PJ, Aktas M, 2005. Detection of *Theileria ovis* infected sheep by nested PCR. *Vet Parasitol*, 127: 99-104.
8. Burr ridge MJ, Brown CG, Kimber CD, 1974. *Theileria annulata*: cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Exp Parasitol*, 35:374-380.
9. Clausen PH, Wiemann A, Patzelt R, Kakaire D, Pötzsch C, Peregrine A, Mehlitz D, 1998. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. *Ann NY Acad Sci*, 29:21-31.
10. Dumanli N, Aktas M, Çetinkaya B, Çakmak A, Köroğlu E, Şaki C.E, Erdoğan Z, Nalbantoğlu S, Ongör H, Şimşek S, Karahan M, Altay K, 2005. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Vet Parasitol*, 127:9-15.
11. İca A, İnci A, Yıldırım A, 2007. Parasitological and molecular prevalence of bovine *Theileria* and *Babesia* species in the vicinity of Kayseri. *Turk J Vet Anim Sci*, 31:33-38.
12. İnci A, Karaer Z, Çakmak A, Günay O, Ataserver A, Nalbantoğlu S, Vatanserver Z, Çam Y, İca A, Yıldırım A, 2003. Kayseri Yöresinde sığırlarda tropikal theileriosis epidemiyoloji üzerine araştırmalar. Kayseri. DPT 98-K12139 nolu projenin final raporu.
13. Kirvar E, İlhan T, Katzer F, Hooshmand-Rad P, Zwegarth E, Gerstenberg C, Phipps P, Brown CG, 2000. Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology*, 120: 245-254.
14. Sparagano O, Loria GR, Gubbels MJ, De Vos AP, Caracappa S, Jongejan F, 2000. Integrated molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species of cattle in Italy. *Ann NY Acad Sci*, 916:533-539.
15. Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, Katayama S, Yamanaka M, Yonemichi H, Hiramatsu K, Baek BK, Sugimoto C, Onuma M, 1993. Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *J Clin Microbiol*, 31:2565-2569.
16. Uilenberg G, 1981. Theilerial species of domestic livestock. In: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S. (Eds.), *Advances in the Control of Theileriosis*. Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 4-37.
17. Vatanserver Z, İca A, Deniz A, Nalbantoğlu S, Karaer Z, Çakmak A, Sparagano O, 2003. Ankara Yöresinde kene kaynaklı protozoon enfeksiyonlarının reverse line blotting (RLB) ve indirekt floresan antikor testi (IFAT) ile saptanması. XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi. Konya. s.94.