

Sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın Reverse Line Blotting, Nested PCR ve Real Time PCR Teknikleri ile Karşılaştırmalı Tanısı ^[1] ^[2]

Alparslan YILDIRIM ¹  Önder DÜZLÜ ¹ Abdullah İNCİ ¹ Zuhâl ÖNDER ¹ Arif ÇİLOĞLU ¹

[1] Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (ERÜ/BAP) tarafından TSA-10-2874 kodlu araştırma projesi ile desteklenmiştir

[2] Bu çalışma, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresinde (5-10 Eylül 2011, Kars) sunulmuştur

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-38039 Kayseri - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-9072

Özet

Bu çalışma, sığırlarda *Babesia bovis* ve *Babesia bigemina*'nın moleküler teşhisinde Reverse Line Blotting (RLB), Nested PCR ve Real Time PCR tekniklerinin kıyaslanması amacıyla planlanmıştır. Türkiye'nin farklı illerindeki sığırlardan daha önce farklı projelerde kullanılmak üzere toplanmış ve laboratuvarında muhafaza edilen 400 adet kan örneğinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'ların konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometrede ölçülmüş ve uygun konsantrasyonları hazırlandıktan sonra RLB, Nested PCR ve Real Time PCR teknikleri ile analiz edilmiştir. RLB sonuçlarına göre incelenen örneklerin toplam 18'inin (%4.50) *B. bovis*, 59'unun (%14.75) *B. bigemina*, 16'sinin (%4.00) *Babesia* spp. ve 2'sinin (%0.50) *B. bovis* + *B. bigemina*; Nested PCR ile 23'ünün (%5.75) *B. bovis*, 71'inin (%17.75) *B. bigemina* ve 7'sinin (%1.75) *B. bovis* + *B. bigemina*; Real Time PCR ile 23'ünün (%5.75) *B. bovis*, 75'inin (%18.75) *B. bigemina* ve 9'unun (%2.00) ise *B. bovis* + *B. bigemina* ile miks enfekte olduğu belirlenmiştir. Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu Nested PCR tekniğinin %94.4 sensitivite ve %100.0 spesifite gösterdiği; RLB tekniğinin ise %88.8 sensitivite ve %100.0 spesifiteye sahip olduğu belirlenmiştir. RLB testinde *Babesia* spp. belirlenen 16 örneğin hem Real Time PCR hem de Nested PCR'da 5'inin *B. bigemina*, 9'unun *B. bovis*, 2'sinin ise *B. bovis* + *B. bigemina* ile miks enfekte olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma ile sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın araştırılmasında Real Time PCR yönteminin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Sığır, Nested PCR, Revers Line Blotting, Real Time PCR

Comparative Diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Cattle by Reverse Line Blotting, Nested PCR and Real Time PCR Techniques

Summary

This study was carried out to compare Reverse Line Blotting (RLB), Nested PCR and Real Time PCR techniques in the molecular diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle. Genomic DNA extractions were performed on 400 blood samples which were previously collected from cattle in various provinces of Turkey and stored in the laboratory with respect to use in different project studies. The concentrations of the DNAs were measured in NanoDrop spectrophotometer and analyzed by RLB, Nested PCR and Real Time PCR techniques after preparing the suitable concentrations. Totally 18 (4.50%), 59 (14.75%), 16 (4.00%) and 2 (0.50%) of examined samples were found to be infected with *B. bovis*, *B. bigemina*, *Babesia* spp. and *B. bovis* + *B. bigemina* mix, respectively by RLB. 23 (5.75%), 71 (17.75%), 7 (1.75%) and 23 (5.75%), 75 (18.75%), 9 (2.00%) of the examined samples were found to be infected with *B. bovis*, *B. bigemina* and *B. bovis* + *B. bigemina* mix by Nested PCR and Real Time PCR, respectively. When comparing the Nested PCR and RLB results with Real Time PCR assay, 94.4% and 88.8% sensitivity and both 100.0% specificity were determined, respectively. 5, 9 and 2 out of the total 16 *Babesia* spp. positivity's in RLB test were determined as *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. bovis* + *B. bigemina* mix, respectively by both Real Time and Nested PCR. In conclusion, Real Time PCR was found to be more sensitive than Nested PCR and RLB in the investigation of *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle with this study.

Keywords: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Cattle, Nested PCR, Revers Line Blotting, Real Time PCR



İletişim (Correspondence)



+90 352 2076666/29941



yildirima@erciyes.edu.tr

GİRİŞ

Babesiosis; Apicomplexa anaç altındaki *Babesia* türlerinin meydana getirdiği, tropik ve subtropik bölgelerdeki evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda da görülen, zoonotik karakterli protozoer bir hastalıktır. Bu hastalığa neden olan *Babesia* türleri, Ixodidae ailesine bağlı vektör kene türleri tarafından transovarial ve transstadial olarak nakledilmektedir ^[1]. *Babesia bigemina* ve *B. bovis* Afrika Asya, Avustralya, Güney Avrupa, Orta ve Güney Amerika ile Türkiye’de de yaygınlık gösteren sığır babesiosis etkenlerinin başında gelmektedir ^[1,2].

Sığırlarda babesiosis’in Türkiye’deki durumu hakkında yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunu mikroskopik ve serolojik çalışmaların oluşturduğu görülmekte olup moleküler çalışmaların sayısının oldukça sınırlı olduğu, Real Time PCR ile ilgili çalışmaların ise bu güne kadar bulunmadığı dikkati çekmektedir ^[3]. Türkiye’nin çeşitli bölgelerinde sığırlarda mikroskopik teşhis tabanlı çalışmalara göre *B. bovis*’in %0.5-%34.8, *B. bigemina*’nın %0.5-%32.2 ^[3-6], serolojik çalışmalara göre *B. bovis*’in %1.3-%51.4, *B. bigemina*’nın %0.9-%100.0 ^[3,4,6,7], sınırlı sayıdaki moleküler tabanlı çalışmalara göre ise *B. bovis*’in %1.8-12.7, *B. bigemina*’nın %0.77-%14.0 ^[2,8-11] arasında prevalans gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışma, Türkiye’nin çeşitli yörelerindeki sığırlardan daha önceki çeşitli proje çalışmalarında kullanılmak üzere toplanmış ve Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında muhafaza edilen EDTA’lı kanlarda sığır babesiosis’inin en yaygın ve önemli iki türü olan *B. bovis* ve *B. bigemina*’nın moleküler teşhisinde Nested PCR, Reverse Line Blotting (RLB) ve Real Time PCR yöntemlerinin kıyaslanmaları amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali ve Kan Örnekleri

Bu araştırma için gerekli etik kurul onayı Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı’ndan alınmıştır (11.11.2009 tarih ve 09/65 sayılı onay belgesi). Çalışmanın materyalini, 2007-2009 yılları arasında, TSA-09-943 kodlu ve “Kayseri Yöresinde Ruminantlarda *Theileria* Türlerinin Filogenetik Analizleri” başlıklı; TSD-08-346 kodlu ve “Karadeniz Bölgesindeki Sığırlardan Elde Edilen *Babesia bovis* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı; TSD-09-700 kodlu ve “Marmara ve Ege Bölgesindeki Sığırlardan Elde Edilen *Babesia bovis* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı; 02-50-1 kodlu ve “Kayseri Yöresinde Sığırlarda Bazı *Babesia* Türlerinin RLB ve IFA Testi ile Karşılaştırmalı Tanısı Üzerine Araştırmalar” başlıklı proje çalışmalarında kullanılmak üzere Türkiye’nin farklı illerindeki sığırlardan toplanmış ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı cryobankında muhafaza edilen 400 adet EDTA’lı kan örneği oluşturmuştur.

Genomik DNA Ekstraksiyonu

EDTA’lı kan örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazı (Bioneer Exiprep™ 16) kullanılarak yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmış ve elde edilen DNA miktarları Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılabilecek -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Reverse Line Blotting (RLB)

Ön aşamada gerekli olan PCR reaksiyonunda, *Theileria* ve *Babesia* soylarındaki parazitlerin 18S rRNA geninin değişken V4 bölgesinden, büyüklüğü yaklaşık 390 ile 430 bp arasında değişen bir bölgeyi amplifiye eden genel primerler (RLB-F2 ve RLB-R2) kullanılmıştır. PCR protokolü ilgili referansa göre ayarlanmıştır ^[12]. PCR sonucu elde edilen amplikonlar jel dökümantasyon sistemi (Gen Genuis) ile agaroz jel üzerinde görüntüledikten sonra her bir örnekten 40 µl amplikon alınarak RLB hibridizasyonunda kullanılmıştır. RLB için piroplasm türleri [Catch All (*Theileria/Babesia*)], *Babesia* spp., *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* ve *B. major* spesifik problemlerle uygun membran hazırlandıktan sonra hibridizasyon basamağına geçilmiştir. RLB sonuçlarının değerlendirilmesinde hiperfilmler üzerinde prob ve PCR ürünlerinin döküldüğü sıraların kesiştiği yerlerde meydana gelen siyah lekeler pozitif olarak kabul edilmiştir ^[12].

Nested-PCR

Sığır kanlarından elde edilen DNA ekstraktları ilk PCR reaksiyonunda *B. bovis* ve *B. bigemina*’nın 18S rRNA gen bölgesinden yaklaşık 582 bp’lık bölgeyi amplifiye eden KB-16 ve KB-17 primerleri ile analize tabii tutulmuştur. İlk PCR’den sonra elde edilen amplikonlardan 0.5 µl alınarak *B. bigemina* için 262 bp’lık bölgeyi amplifiye eden KB-18 ve KB-19, *B. bovis* için ise 217 bp’lık bölgeyi amplifiye eden KB-24 ve KB-25 tür spesifik primerleri ile Nested PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR protokolleri ilgili referansa göre belirlenmiştir ^[13]. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) %1.5’lik agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Real Time-PCR

Kan örneklerinde *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin Real Time PCR ile araştırılmasında sırası ile Sybergreen ve TaqMan prob bazlı qPCR kullanılmıştır. Sybergreen tabanlı qPCR’da FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak *B. bovis*’in Msa2c gen bölgesinden 97-bp’lık bölgeyi amplifiye eden Msa2c 2F, Msa2c 2R primerleri ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir ^[14]. Analizlerde pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bovis* izolatları, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR

master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde hazırlanmış ve termal profil ilgili referansa göre belirlenmiştir^[14].

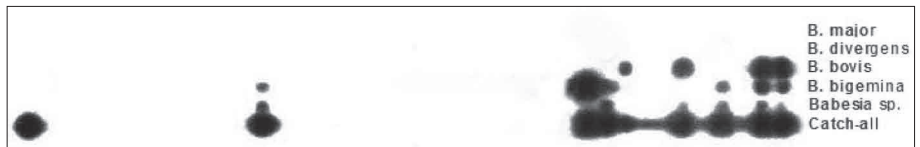
TaqMan prob bazlı qPCR'da Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, USA) kullanılarak *B. bigemina*'nın RAP-1 gen bölgesinden dizayn ettiğimiz 95-bp'lik bölgeyi amplifiye eden Rap1 F (5'-TCAGCGACTAC GTCCATTTG-3') ve Rap1 R (5'-AATCAACTTGGCAGGGT CAG-3') orijinal primerleri ve aynı gen bölgesinden Rap1 P orijinal probu (5'-HEX-CCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAA-BHQ1-3') ile örneklerin Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Dizayn edilen primerler ve probun spesifiteleri blastn ve Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) analizleri ve çeşitli genetik yazılımlarla kontrol edilmiş, ayrıca anabilim dalındaki *B. bigemina*, *B. bovis*, *T. orientalis* ve *T. annulata* referans izolatları kullanılarak etkinlik ve özgünlük açısından değerlendirilmiştir. Örneklerin işlenmesinde pozitif kontrol olarak anabilim dalındaki referans *B. bigemina* izolatı, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır. PCR master mix üreticinin açıklamalarına göre toplam 25 µl hacimde; master mix 12.5 µl, Rap1 F (10 pmol) 1.0 µl, Rap1 R (10 pmol) 1.0 µl, Rap1 P (10 pmol) 1.0 µl, genomik DNA 50 ng µl ve steril deiyonize su 8.5 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Real Time PCR'da termal protokol 50°C'de 2 dk; 95°C'de 10 dk; 45 siklus, denaturation: 95°C'de 20 sn, annealing: 55°C'de 1 dk, olacak şekilde programlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Sığırdada *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan yöntemlerin istatistiksel olarak sensitivite ve spesifiteleri ilgili referansa göre belirlenmiştir^[15]. Testler arasındaki uyumun belirlenmesinde Kappa testi kullanılmıştır.

Şekil 1. Bazı pozitif örneklerde RLB sonuçlarının görüntüsü

Fig 1. The image of RLB results in some positive samples



BULGULAR

RLB Sonuçları

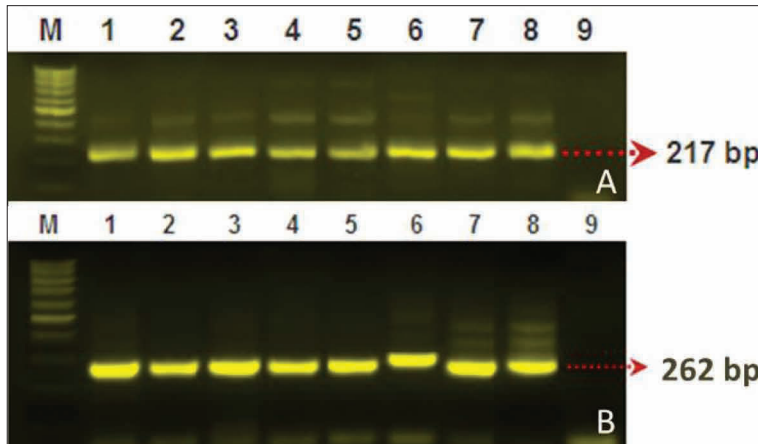
RLB analizi sonucu pozitif belirlenen bazı örneklerin hiperfilm üzerindeki görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir. RLB sonuçlarına göre 400 sığırdan toplam 18'inin (%4.50) *B. bovis*, 59'unun (%14.75) *B. bigemina*, 16'sinin (%4.00) *Babesia* spp. ve 2'sinin (%0.50) *B. bovis* ve *B. bigemina* miks enfekte olduğu saptanmıştır. *Babesia* soy ve tür spesifik problemlerle pozitiflik veren tüm örneklerin Catch-all proba da pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür. Ayrıca incelenen örneklerde Catch-all (*Theileria/Babesia*) proba sinyal verip *Babesia* soy ve tür spesifik problemlere sinyal alınamayan toplam 48 örnek (*Theileria* soyunda) belirlenmiştir.

Nested PCR Sonuçları

Nested PCR'in 2. PCR basamağında *B. bigemina* için 18S rRNA gen bölgesinden 262 bp'lik bölgeyi amplifiye eden KB-18 ve KB-19 primerleriyle ve *B. bovis* için ise 18S rRNA gen bölgesinden 217 bp'lik bölgeyi amplifiye eden KB-24 ve KB-25 primerler ile analiz sonucu pozitif belirlenen bazı izolatların jel agarozdaki görünümü Şekil 2'de verilmiştir. Nested PCR sonuçlarına göre 400 sığırdan toplam 23'ünde (%5.75) *B. bovis*, 71'inde (%17.75) *B. bigemina* ve 7'inde (%1.75) ise *B. bovis* + *B. bigemina* miks enfeksiyon saptanmıştır.

Real Time PCR Sonuçları

Sybergreen tabanlı qPCR'da, *B. bovis*'in *Msa2c* gen bölgesinden 97-bp'lik bölgeyi amplifiye eden *Msa2c* 2F, *Msa2c* 2R primerleri ile örneklerin analizi sonucu pozitif belirlenen bazı örneklerin amplifikasyon ve melting eğrileri Şekil 3'te gösterilmiştir. Pozitif örneklerde ortalama çözünme sıcaklığı (Tm) 78.1°C (±0,2°C) olarak saptanmıştır. Pozitif



Şekil 2. Nested PCR analizinin 2. PCR basamağında *B. bovis* ve *B. bigemina* pozitif belirlenen bazı örneklerin agaroz jel üzerindeki görünümü. M: Marker (100bp), 1-7: Pozitif örnekler, 8: Pozitif kontrol, 9: No DNA

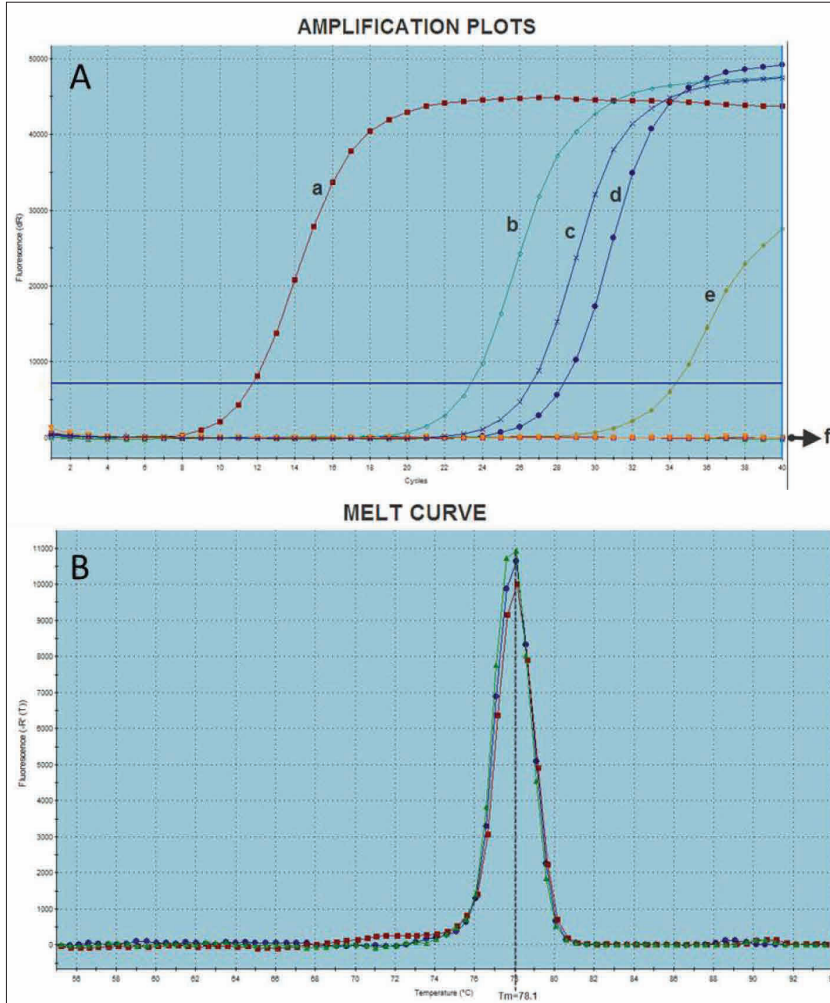
Fig 2. Some *B. bovis* and *B. bigemina* positive samples on agarose gel at the 2nd step of the Nested PCR analyses. M: Marker (100bp), 1-7: Positive samples, 8: Positive control, 9: No DNA

örneklerde parazitemi açısından belirlenen Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerleri ortalama 33.2 (22.3-41.8) olarak belirlenmiştir.

TaqMan prob tabanlı qPCR'da *B. bigemina*'nın RAP-1 gen bölgesinden 95-bp'lik bölgeyi amplifiye eden *Rap1 F* ve *Rap1 R* primerleri ve aynı gen bölgesinden dizayn edilen *Rap1 P* probunun kullanılmasıyla belirlenen bazı pozitif örneklerin amplifikasyon eğrileri Şekil 4'te verilmiştir.

Pozitif örneklerde parazitemi açısından belirlenen Ct (dR) değerleri ortalama 36.3 (15.7-44.0) olarak saptanmıştır.

Babesia bigemina'nın *Rap1* gen bölgesinden dizayn ettiğimiz primer ve probunların GenBank'a kayıtlı tüm *B. bigemina* *Rap1* izolatları ile alignmentları Şekil 5'te gösterilmiştir. *Rap1F* primerinin M85186 izolatı ile %95, diğer tüm izolatlar ile %100; *Rap1R* primerinin ise AF017284 ve AF017294 izolatları ile %95, diğer tüm izolatlar ile

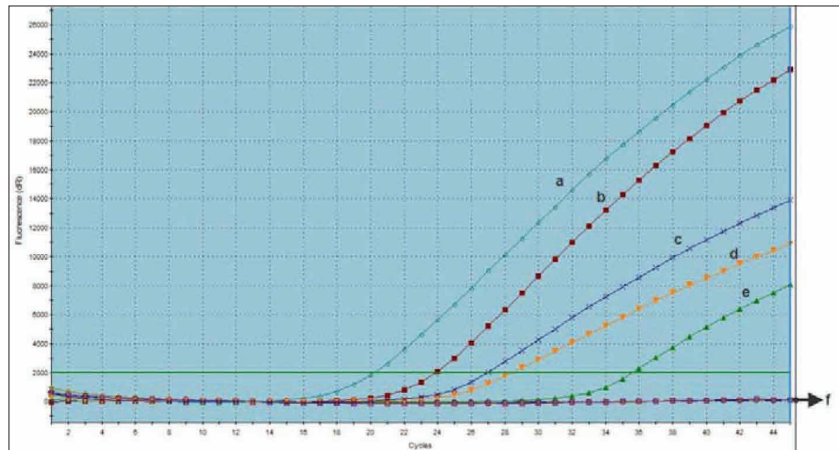


Şekil 3. Sybergreen Real Time PCR analizleri sonucu *B. bovis* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon grafikleri (A) ve erime eğrileri (melting curve); $T_m=78.1$ (B). a: *B. bovis* pozitif kontrol DNA; b,c,d,e: *B. bovis* pozitif örnekler; f: No DNA, *B. bigemina*, *T. annulata*, *T. orientalis*

Fig 3. Amplification plots (A) and melting curves (B) of some *B. bovis* positive samples in Sybergreen Real Time PCR assay. a: *B. bovis* positive control DNA; b,c,d,e: *B. bovis* positive samples; f: No DNA, *B. bigemina*, *T. annulata*, *T. orientalis*

Şekil 4. TaqMan Prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu *B. bigemina* pozitif saptanan bazı örneklerin amplifikasyon eğrileri. a: *B. bigemina* pozitif kontrol DNA; b,c,d,e: *B. bigemina* pozitif örnekler; f: No DNA, *B. bovis*, *T. annulata*, *T. orientalis*

Fig 4. Amplification curves of some *B. bigemina* positive samples in TaqMan Prob based Real Time PCR assay. a: *B. bigemina* positive control DNA; b,c,d,e: *B. bigemina* positive samples; f: No DNA, *B. bovis*, *T. annulata*, *T. orientalis*



%100 identik olduğu belirlenmiştir. Rap1P probu ise tüm izolatlarla %100 identiklik göstermiştir. Yapılan Blastn ve Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) analizleri sonucu dizayn edilen primerler ve probun *B. bigemina* spesifik olduğu teyit edilmiştir. Bunun yanında laboratuvarında mevcut *B. bovis*, *T. orientalis* ve *T. annulata* referans izolatlarıyla yapılan analizlerde de söz konusu izolatlar ile herhangi bir amplifikasyon olmadığı görülmüştür (Şekil 4).

Real Time PCR sonuçlarına göre 400 sığırdan toplam 23'ünde (%5.75) *B. bovis*, 75'inde (%18.75) *B. bigemina* ve 9'unda ise (%2.00) *B. bovis* + *B. bigemina* miks enfeksiyon saptanmıştır.

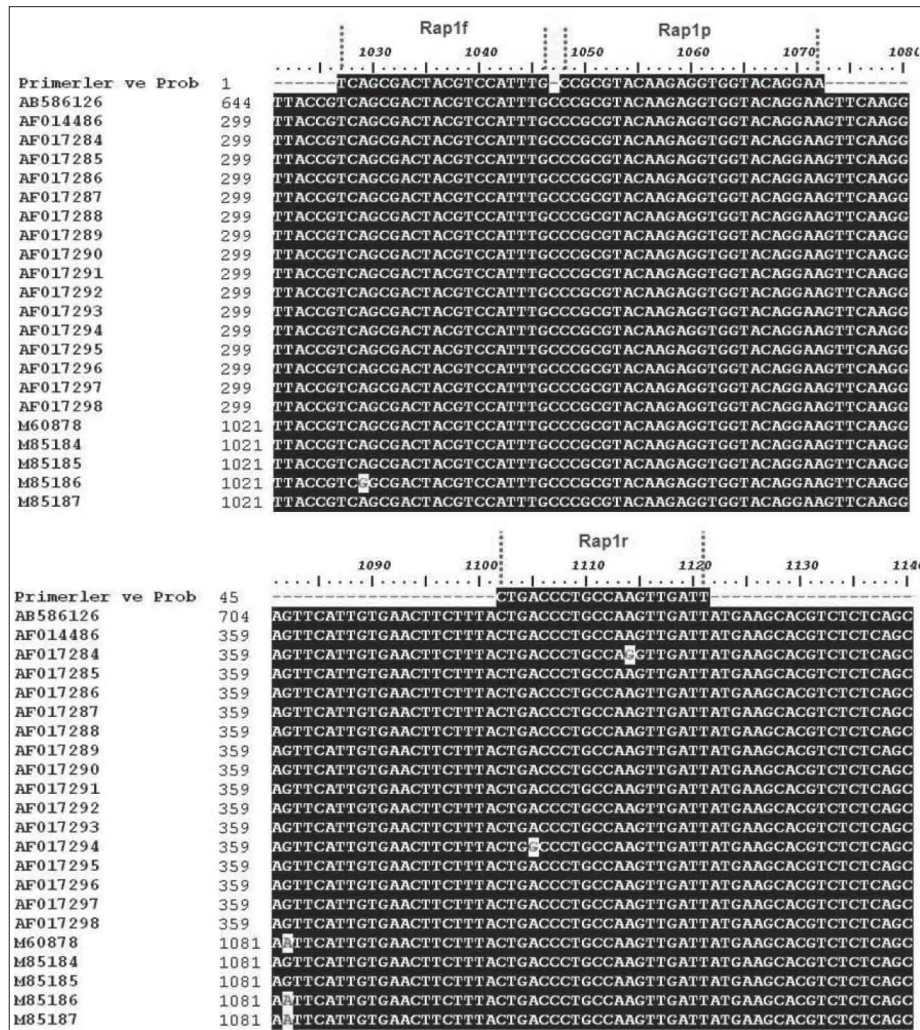
RLB, Nested PCR ve Real Time PCR Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Sığırlarda *Babesia* enfeksiyonlarının teşhisinde RLB, Nested PCR ve Real Time PCR tekniklerinin etkinlikleri açısından yapılan istatistiksel analiz Tablo 1'de verilmiştir. Bu değerlendirmede gold test Real Time PCR olarak alınmıştır. Nested PCR tekniğinin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu %94.4 sensitivite (%88.3-97.4; %95

Güven aralığı) ve %100.0 spesifite (%98.7-100.0; %95 Güven aralığı) gösterdiği belirlenmiştir. RLB tekniğinin Real Time PCR tekniği ile kıyaslanması sonucu ise %88.8 sensitivite (%81.4-93.5; %95 Güven aralığı) ve %100.0 spesifite (%98.7-100.0; %95 Güven aralığı) gösterdiği saptanmıştır. Kappa testi ile Real Time PCR ve Nested PCR arasında %96.1 ($P < 0.05$), Real Time PCR ve RLB arasında %92.1 ($P < 0.05$) ve Nested PCR ile RLB arasında ise %95.9 ($P < 0.05$) oranında uyum olduğu belirlenmiştir. RLB testinde *Babesia* spp. olarak belirlenen 16 örneğin hem Real Time hem de Nested PCR'da 5'inin *B. bigemina*, 9'unun *B. bovis*, 2'sinin ise *B. bovis* + *B. bigemina* miks olduğu ortaya konmuştur. Nested PCR'da negatif belirlenen 6 örneğin Real Time PCR'da Ct (dR) değerlerinin 40'tan büyük olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Moleküler tabanlı teşhis yöntemleri son yıllarda birçok paraziter enfeksiyonun yanında sığır *Babesia* türlerinin spesifik teşhisinde ve genotiplendirilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında RLB yöntemi, PCR ürünlerinin bir membranda ayrı sıralara bağlanmış özgün problemlere hibridizasyonu esasıyla çalışmaktadır. Teknik,



Şekil 5. *B. bigemina*'nın Rap1 gen bölgesinden dizayn edilen primerler ve probun, GenBank'a kayıtlı diğer *B. bigemina* sekanslarıyla multiple alignmentları

Fig 5. Multiple alignments of the primers and probe designed from Rap1 gene region of *B. bigemina* with the other *B. bigemina* sequences from GenBank

Tablo 1. Babesiosis'in teşhisinde kullanılan tekniklerin Gold Teste göre sensitivite ve spesifiteleri**Table 1.** Sensitivity and specificities of the techniques used in the diagnosis of babesiosis according to the Gold Test

| Yöntem | | Real Time PCR (Gold Test) | | | Sensitivite (%95 Güven Aralığı) | Spesifite (%95 Güven Aralığı) |
|------------|--------|---------------------------|-----|--------|------------------------------------|----------------------------------|
| | | + | - | Toplam | | |
| RLB | + | 95 | 0 | 95 | 0.888 (0.814-0.935) | 1.000 (0.987-1.000) |
| | - | 12 | 293 | 305 | | |
| | Toplam | 107 | 293 | 400 | | |
| Nested PCR | + | 101 | 0 | 101 | 0.944 (0.883-0.974) | 1.000 (0.987-1.000) |
| | - | 6 | 293 | 299 | | |
| | Toplam | 107 | 293 | | | |

birçok etkeninin eş zamanlı teşhisine imkan sağladığından oldukça pratik ve kullanışlıdır. Bu yöntemin kan protozoonlarının teşhisinde kullanılması, ilk kez Gubbels ve ark.^[16] tarafından gerçekleştirilmiş olup, çalışmada 18S rRNA geninin V4 değişken bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR'da çoğaltılan ampikonlar RLB tekniğinde kullanarak sığırlarda görülen *Theileria annulata*, *T. parva*, *T. mutans*, *T. taurotragi*, *T. velifera*, *B. bovis*, *B. bigemina* ve *B. divergens*'in eş zamanlı özgül teşhislerinin yapılabileceği belirlenmiştir. Bu çalışmada, sahip olduğu avantajlarla son yıllarda dünyada ve Türkiye'de sığır babesiosis'inin teşhisinde yaygın olarak kullanılan RLB tekniğiyle, Real Time PCR ve Nested PCR yöntemlerinin *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın teşhisindeki etkinlikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Real Time PCR ile pozitif belirlenen 12 örnek RLB testi ile negatif belirlenmiş, 16 örneğin ise *Babesia* sp. düzeyinde pozitiflik verdiği görülürken, tür düzeyinde reaksiyon vermediği saptanmıştır. RLB testinde *Babesia* sp. proba sinyal verip *Babesia* tür spesifik probalara sinyal alınamaması, kullanılan probaların sensitivitesinin düşük olabileceğini gösterebileceği gibi, membranın yıkanması ve tekrar kullanılması esnasında probaların membranından uzaklaştırılmış olması ile de ilişkili olabilir. Nitekim RLB tekniğinin, spesifik olmayan PCR ve akabinde hibridizasyon prosedürü olmak üzere iki basamaklı bir prosese sahip olması sebebiyle PCR reaksiyonlarında substrat için kompetisyon ve RLB testi süresince amplifiye DNA için farklı hibridizasyon ısıları gibi çeşitli değişkenlerin her basamakta sensitiviteyi düşürebileceği kaydedilmiştir^[17]. Bu sonuçlarla RLB testinin, Real Time PCR testine göre sensitivitesi %88.8 olarak belirlenmiştir. Saptanan bu sensitivite değeri Nested PCR ve Real Time PCR yöntemlerine oranla düşük olmasına karşın genel çerçevede yüksek gözükmektedir. Bunun yanında RLB testinin spesifitesi ise %100 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar söz konusu testin sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının teşhisinde güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Georges ve ark.^[17], evcil kedilerde haemoplazmaların Real Time PCR ve RLB teknikleri ile karşılaştırmalı tanısı üzerine yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar bildirmişlerdir. Araştırmacılar^[17], RLB ve Real Time PCR ile incelenen toplam 152 kedi kanından ekstrakte edilmiş genomik DNA örneklerinde *Candidatus Mycoplasma haemominutum*'u sırasıyla 40

ve 48; *Mycoplasma haemofelis*'i 11 ve 47; *Candidatus Mycoplasma turicensis*'i ise yalnızca Real Time PCR'da 3 örnekte pozitif belirlemişler, ayrıca miks haemoplasma enfeksiyonlarını RLB ile 5, Real Time PCR ile 19 örnekte saptamışlardır. Çalışmada^[17] Real Time PCR tekniği gold standart alınarak yapılan istatistiksel hesaplamalarda RLB tekniğinin %64.7 sensitivite ve %100 spesifite gösterdiği de kaydedilmiştir.

Nested PCR yöntemi, standart PCR'a farklı primerle ikinci bir amplifikasyon uygulanması esasına dayanan moleküler bir tekniktir. İlk amplifikasyonda elde edilen ürün ikinci PCR aşamasında kalıp olarak kullanılır. Kullanılan ikinci primer takımı hedef diziyeye özgüdür. Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizilerin spesifik bir şekilde amplifikasyonu klasik PCR yöntemleriyle bazen mümkün olmadığı görülmekte ve oluşan non-spesifik fragmentlerin amplifikasyonu sonucu yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Nested PCR ile söz konusu bu olumsuzluk giderilmekte, aynı zamanda düşük DNA'ya sahip örneklerde ikinci kez PCR uygulaması ile teşhisteki sensitivite artırılabilir^[13,18]. Son yıllarda ruminant ve vektör kenelerde babesiosis'in spesifik teşhisinde nested PCR yönteminin sıklıkla uygulandığı görülmektedir^[13,19,20]. Kene ve sığırlarda *Babesia* türlerinin Nested-PCR ile araştırılması amacıyla 18S rRNA gen bölgesini hedef alan çeşitli primer dizileri dizayn edilmiştir^[13,21-23]. Ancak bu primer çiftlerinin çoğunun^[21-23] blastn analizi sonucu *B. bigemina* ve *B. bovis* teşhisi için GenBank'ta mevcut bazı izolatlarla ait dizilimlerle uyumsuzluk gösterdiği ve bu durumun da teşhis zorluklarına ve yanlış negatifliklere yol açabileceği belirtilmiştir^[13]. Bu çalışmada kullanılan ve Guerrero ve ark.^[13] tarafından dizayn edilen Nested primerlerinin, araştırmacıların belirttiği gibi blastn analizi sonucu yüksek spesifite gösterdiği ve dizilimlerin GenBank'a kayıtlı tüm *B. bovis* ve *B. bigemina* 18S rRNA dizilimleri ile uyumluluk gösterdiği görülmüştür. Nested PCR yönteminin sığır babesiosis'inin teşhisindeki sensitivitesi Real Time PCR'a göre %94.4, spesifitesi ise %100 belirlenmiştir. RLB testinde negatif belirlenen 6 örnek Nested PCR ile pozitif belirlenmiş, ayrıca soy düzeyinde RLB ile pozitif belirlenen 16 örneğin bu test ile tür bazlı pozitiflik verdiği saptanmıştır. Nested PCR yönteminin göstermiş olduğu sensitivite ve spesifite

ile sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina* enfeksiyonlarının teşhisinde güvenilir bir şekilde kullanılabileceği görülmektedir.

Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Son yıllarda sığır babesiosis'inin spesifik teşhisinde de kullanılmaya başlanan 18S rRNA, mitokondrial cytochrome b ve msa2c gibi farklı gen bölgeleri hedef alınarak dizayn edilen spesifik primer ve prob lar ile Real Time PCR araştırmalarının yapıldığı görülmektedir [14,24,25]. Criado-Fornelio ve ark.[25], iki farklı qPCR yönteminin sığır babesiosis'inin teşhisindeki etkinliğini araştırmışlar, hem TaqMan prob hem de FRET prob bazlı qPCR denemelerinde yüksek sensitivite ve spesifite belirlemişlerdir. Her iki teknik için de saptama limiti (linear kalibrasyon eğrileri) 0.1 fg/µl-0.01 ng/µl olarak bildirilmiştir. Saha örnekleri üzerinde iki tekniğin uygulanması sonucu, spesifitelerinin %100 olmasına karşın sensitivitenin TaqMan prob bazlı qPCR yönteminde daha yüksek belirlediklerini kaydetmişlerdir [25]. Ramos ve ark.[14], *B. bovis*'in msa2c gen bölgesini hedef alarak dizayn ettikleri sybergreen tabanlı qPCR tekniğinin teşhisteki etkinliğini ortaya koyma amacı ile yaptıkları çalışmada, blastn analizleri ve *B. bigemina*, *A. marginale* ve *Bos taurus* referans DNA'larını kontrol olarak kullanarak, dizayn ettikleri primerlerin tür spesifik olduğunu kaydetmişlerdir. Çalışmada [14] qPCR tekniğinin enfeksiyonu saptama limiti, msa2c kopya sayısı ve eşik değer siklusu arasındaki linear korelasyona göre ml kanda 1000 kopya olarak saptamış, ortalama çözünme sıcaklığı (Tm) da 77.41±0.25°C belirlenmiştir. Araştırmacılar [14] qPCR'ın sensitivitesini konvansiyonel PCR'a göre yüksek belirlemişler ve iki teknik arasındaki uyumu %88.8 (Kappa indeks=0.75) bulmuşlardır. Bu çalışmada ise Real Time PCR teknikleri ile RLB testine göre 12, Nested PCR testine göre ise 6 örnek pozitif belirlenmiş olup RLB testinde soy düzeyinde pozitiflik veren örneklerin hepsinin tür identifikasyonları yapılmıştır. Ayrıca Nested PCR'da negatif belirlenen 6 örneğin Real Time PCR'da Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değerlerinin yüksek olduğu (>40) belirlenmiş ve neticede bu örneklerde paraziteminin oldukça düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada elde edilen verilere ve diğer araştırmaların [14,25] sonuçlarına göre sensitivite ve spesifite hesaplamalarında Real Time PCR tekniği standart gold test olarak alınmıştır. Kappa testi ile Real Time PCR ve Nested PCR arasında %96.1 (P<0.05), Real Time PCR ve RLB arasında %92.1 (P<0.05) ve Nested PCR ile RLB arasında ise %95.9 (P<0.05) oranında uyum saptanmıştır. Elde edilen sonuçların araştırmacıların [14,24,25] bulguları ile uyum gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte Ramos ve ark.[14] tarafından dizayn edilen syber green tabanlı qPCR primerlerinin spesifiteleri blastn analizleri ve Anabilim Dalı cryobankında mevcut olan *B. bigemina*, *T. annulata* ve *T. orientalis* referans

DNA'ları kullanılarak konfirme edilmiştir. Çalışmada *B. bovis* için bulunan 78.1±0.2°C Tm değeri Ramos ve ark.[14] tarafından bildirilen Tm değeri ile uyum göstermiştir. Apicomplexan protozoonların apikal organellerinden salgılanan proteinler, parazitin konak hücresi içerisine invaze olmasında ve hücre içinde kalmasında çok önemli rol oynamaktadır [26]. Bu proteinler arasında rhostry-associated protein-1 (Rap-1) gen familyasının moleküler karakteri, *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinde tam olarak ortaya konmuş olmakla birlikte, bu genin diğer tüm *Babesia* türlerinde de bulunduğu kaydedilmiştir [27-29]. Rap-1 gen familyası proteinleri, sahip olduğu çeşitli immünolojik epitoplarla spesifik antikorların oluşumuna yol açmaktadır. Oluşan antikorların da merazoitlerin sağlam eritrositlere invaze olmasını engellediği gösterilmiştir [30,31]. Bu yüzden söz konusu proteine ait Rap-1 gen bölgesi *B. bovis* ve *B. bigemina* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde ve çeşitli aşı çalışmalarında temeli teşkil etmiştir. Bu çalışmada *B. bigemina*'nın Rap-1 gen bölgesi hedef alınarak primer ve prob dizaynı yapılmış ve dizilimlerin GenBank'a kayıtlı tüm *B. bigemina* Rap-1 izolatları ile alignmentları gerçekleştirilmiştir. Blastn ve Primer Blast analizleri sonucu dizayn edilen primer ve prob ların *B. bigemina* spesifik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca laboratuvarında mevcut *B. bovis*, *T. orientalis* ve *T. annulata* referans izolatları ile yapılan Real Time PCR analizinde de söz konusu izolatlar ile herhangi bir amplifikasyon olmadığı saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, dizayn edilen primerler ve probun *B. bigemina* enfeksiyonlarının Real Time PCR ile kantitatif spesifik teşhisinde güvenle kullanılabilceğini göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın araştırılmasında Real Time PCR yönteminin Nested PCR ve RLB tekniklerine oranla daha duyarlı olduğu, özellikle düşük paraziteli rezervuar hayvanların belirlenmesi, kantitasyona olanak sağlaması ve dolayısıyla tedavi etkinliğinin tür bazlı takibi gibi çalışmalarda sahip olduğu avantajlarla öne çıktığı görülmüştür. Bunun yanında her üç tekniğin de bu enfeksiyonların teşhisinde yüksek spesifiteye sahip olduğu ve sığırlarda *B. bovis* ve *B. bigemina*'nın teşhisinde ve moleküler epidemiyolojik çalışmalarda güvenli bir şekilde kullanılabilcekleri belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W: Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, 247-269, 2004.
2. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A: Karadeniz bölgesi'ndeki sığırlardan elde edilen *Babesia bovis* suşlarının moleküler karakterizasyonu. *ERÜ Sağ Bil Derg*, 20 (1): 18-28, 2011.
3. Düzlü Ö, Yıldırım A, İnci A: Türkiye'de evcil ruminantlarda babesiosis. *T Klin Vet Bil Derg*, 3 (2): 27-34, 2012.
4. İnci A: Ankara'nın Çubuk ilçesinde sığırlarda babesiosis'in seroinsidensi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 39 (1-2): 153-167, 1992.
5. Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E, Yılmaz F: Malatya ve Güneydoğu Anadolu illerinde sığır, koyun ve keçilerde bulunan kan parazitleri ve yayılışları. *Turk J Vet Anim Sci*, 17 (3): 209-215, 1993.

- 6. Aktaş M, Dumanlı N, Karaer Z, Çakmak A, Sevgili M:** Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde sığırlarda *Babesia* türlerinin seroprevalansı. *Türk J Vet Anim Sci*, 25 (4): 447-451, 2001.
- 7. Kalkan K, Özçelik S, Malatyalı E:** Sivas'ta sığırlarda babesiosis prevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 34 (1): 11-16, 2010.
- 8. İça A:** Sığırlarda bazı *Babesia* türlerinin indirek floresan antikor ve reverse line blotting yöntemi ile karşılaştırmalı tanısı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 1 (2): 77-85, 2004.
- 9. Tanyüksel M, Vatanserver Z, Karaer Z, ve Araz E, Haznedaroğlu T, Yukarı BA:** Sığır babesiosisinin epidemiyolojisi ve zoonotik önemi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 26 (1): 42-47, 2002.
- 10. Altay K, Aydın MF, Dumanlı N, Aktas M:** Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Vet Parasitol*, 158, 295-301, 2008.
- 11. Aktas M, Altay K, Ozubek S, Dumanlı N:** A survey of ixodid ticks feeding on cattle and prevalence of tick-borne pathogens in the Black Sea region of Turkey. *Vet Parasitol*, 187 (3-4), 567-571, 2012.
- 12. Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, Sparagano O:** Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol*, 99, 273-286, 2001.
- 13. Guerrero FD, Bendeke KG, Davey RB, George JE:** Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in south Texas. *Vet Parasitol*, 145 (1-2): 156-163, 2007.
- 14. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, Oliveira RH, Soares CO, Rosinha GM, Alves LC:** Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol*, 176 (1): 79-83, 2011.
- 15. Lalkhen AG, McCluskey A:** Clinical tests: sensitivity and specificity. *CEACCP*, 8 (6): 221-223, 2008
- 16. Gubbels MJ, De Vos S, Van Der Weide M, Viseras J, Schouls LM, De Vries E, Jongejan F:** Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species using reverse line blotting hybridization. *J Clin Microbiol*, 37, 1782-1789, 1999.
- 17. Georges K, Ezeokoli C, Auguste T, Seepersad N, Pottinger A, Sparagano O, Tasker S:** A comparison of real-time PCR and reverse line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. *BMC Vet Res*, 8 (103): 1-8, 2012.
- 18. Kim DM, Park G, Kim HS, Lee JY, Neupane GP, Graves S, Stenos J:** Comparison of conventional, nested, and real-time quantitative PCR for diagnosis of scrub typhus. *J Clin Microbiol*, 49 (2): 607-612, 2011.
- 19. AbouLaila M, Yokoyama N, Igarashi I:** Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Vet Parasitol*, 172 (1-2): 65-70, 2010.
- 20. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Jittapalpong S, Xuan X, Igarashi I:** Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet Parasitol*, 178 (3-4): 201-207, 2011.
- 21. Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P:** Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol*, 37, 86-92, 2004.
- 22. Calder JA, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RA, Smith C, Dame JB:** Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J Clin Microbiol*, 34 (11): 2748-2755, 1996.
- 23. Oliveira-Sequeira TC, Oliveira MC, Araujo JP Jr, Amarante AF:** PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol*, 35 (1): 105-111, 2005.
- 24. Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I:** Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg*, 77 (5): 837-841, 2007.
- 25. Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, Benitez D, Florin-Christensen M, Gonzalez-Oliva A, Henriques G, Silva M, Alongi A, Agnone A, Torina A, Madruga CR:** Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet Parasitol*, 162, 200-206, 2009.
- 26. Sam-Yellowe TY:** Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today*, 12 (8): 308-316, 1996.
- 27. Kappmeyer LS, Perryman LE, Hines SA., Baszler TV, Katz JB, Hennager SG, Knowles DP:** Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 37 (7): 2285-2290, 1999.
- 28. Skuce PJ, Mallon TR, Taylor SB:** Molecular cloning of a putative rhoptry protein homologue from *Babesia divergens*. *Mol Biochem Parasitol*, 77 (1): 99-102, 1996.
- 29. Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, McElwain TF:** Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. *Mol Biochem Parasitol*, 93 (2): 215-222, 1998.
- 30. Machado RZ, McElwain TF, Pancraccio HP, Freschi CR, Palmer GH:** *Babesia bigemina*: Immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia. *Exp Parasitol*, 93 (2): 105-108, 1999.
- 31. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I:** Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet Parasitol*, 138 (1-2): 22-32, 2006.