



Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Yöntemi ile Sığır Brusellozunun Hızlı Teşhisi

Osman Yaşar TEL¹, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK^{1*}, Oktay KESKİN¹

¹Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi/Received

14.02.2018

Kabul Tarihi/Accepted

10.05.2018

Yayın Tarihi/Published

30.06.2018

Öz

Bruselloz, sığır, koyun, keçi, domuz ve koç gibi hayvanlarda, özellikle, testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan zoonoz bir hastalıktır. Bu çalışmada bruselloz hastalığının çabuk tanısında BCSP31 genini temel alan duyarlı ve özgül özel bir moleküler teknik olan ilmek aracılı bir gen çoğaltma tekniğinin (loop mediated isothermal amplification), kullanılması amaçlandı. Bruselloz şüpheli hayvanlardan alınan 20 adet süt ve 37 adet aborte fötüs olmak üzere toplam 57 adet materyal LAMP ve kültür yöntemiyle incelendi. İncelenen materyallerin 13 adedi (%22,8) LAMP ile pozitif bulunurken, kültür yöntemi ile örneklerin 10'undan (%17,5) etken izole ve identifiye edildi. Sonuç olarak, LAMP tekniğinin bruselloz teşhisinde güven ile kullanılabilceği, LAMP testiyle beraber kültür yönteminin uygulanmasının teşhis sensitivitesinin artırılmasında yararlı olduğu saptandı. LAMP testinin spesifite ve sensitivitesinin yüksek olmasına rağmen hala kültür yönteminin altın standart olarak geçerliliğini sürdürdüğü düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bruselloz, LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification), moleküler teşhis, sığır.

Rapid Diagnosis of Bovine Brucellosis by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay

Abstract

Brucellosis is a zoonotic infection that cause abortions and infertility in livestock by effecting of especially genital organs like uterus, testes, mammary glands. In this study, it was aimed to use loop mediated isothermal amplification (LAMP), which is sensitive and specific molecular technique that based on amplification of BCSP31 gene, which is unique to organisms in the genus Brucella. In this study, a total of 57 materials including 20 milk samples and 37 aborted fetuses were tested by LAMP and classical bacterial culture for diagnosis of brucellosis. Thirteen (22.8%) out of 57 samples were found positive by LAMP while 10 samples (17.5%) yielded bacterial growth. As a conclusion, LAMP could be used satisfactorily for the diagnosis of brucellosis and the sensitivity can be increased by using two techniques together. We concluded that the bacterial culture is still gold standard for diagnosis of brucellosis although the sensitivity and specificity of the LAMP is high.

Key Words: Brucellosis, cattle, LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification), molecular diagnosis.

GİRİŞ

Bruselloz, gerek insan ve hayvan sağlığı, gerekse ekonomik kayıplar açısından dünyanın en yaygın zoonoz hastalıkları arasında sayılmakta ve ülkemizde de en önemli hastalıklar arasında bulunmaktadır (1). Ülkemizde hastalığın teşhisinde insanlarda seroloji ön plana çıkmakla beraber hayvanlarda kitle aşılama geçilmesinden dolayı serolojik testler aşı ve infeksiyon sonrasında şekillenen antikorların birbirlerinden ayrılmasından dolayı aşılama olan hayvanlarda güvenle kullanılamamaktadır (2).

Günümüzde *Brucella* infeksiyonunun tanısında altın standart kültür yöntemidir. Fakat bu yöntem ile sonuç alınması uzun zaman ve uzmanlık gerektirmekte ve laboratuvar personeli için büyük risk içermektedir. Ayrıca kültürün sensitivitesi besiyerine ve numunenin alım zamanına göre %50- 90 arasında değişmektedir. Serolojik olarak ELISA, CFT (Komplement Fiksasyon Testi), SAT (Serum Aglutinasyon Testi) gibi testler hızlı sonuç vermesine rağmen *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholera* *Salmonella* grup N gibi benzer antijene sahip bakterilerden

dolayı yanlış pozitif reaksiyonlar görülebilmektedir (1, 2, 3). LAMP metodu (Loop Mediated Isothermal Amplification) Notomi ve ark. (4)'ları tarafından geliştirilen çok özel bir DNA çoğaltma yöntemidir ve hızlı, güçlü ve diğer metotlarla karşılaştırıldığında çok düşük düzeydeki DNA'yı tespit edebilmektedir. LAMP brusellozun teşhisinde kullanılan oldukça spesifik bir metottur (5). Son yıllarda LAMP ile ilgili çalışmaların sayısı hızlı bir şekilde artmaktadır (5-7, 8-10). LAMP yöntemi lateral flow araçlara adapte edilebilmektedir. Böylece testin maliyeti azaltılarak testin sonucu kısa sürede alınabilmektedir.

Bu çalışmada brusellozun çabuk tanısında BCSP31 genini temel alan duyarlı ve özgül özel bir moleküler teknik olan, ilmek aracılı bir gen çoğaltma tekniğinin (loop mediated isothermal amplification) kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Klinik örnekler: Bu çalışmada 20 adet süt örneği ve 37 adet aborte fötüs materyali *Brucella* etkenlerinin varlığı yönünden incelendi. Süt numuneleri meme başı temizlenip alkol ile silindikten sonra ilk süt atılıp, daha sonraki süt steril falkon tüplerine konularak soğuk zincirde laboratuvara getirildi.

Kültür: Klinik örneklerden *Brucella spp.* izolasyonu OIE (11)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı. *Brucella* izolasyonu için selektif besiyeri olarak Farrel's besiyeri kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanmasında serum ve dekstroz ilave edilmiş triptik soy agar (Difco) ve selektifliği sağlamak için ticari supplement (SR0083, Oxoid) kullanıldı. Bu besiyerinde örnekler % 5-10 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

Biotiplendirme: Karbondioksit (CO₂) gereksinimi, hidrojenülfür (H₂S) üretimi, boyalı besiyerlerinde üreme, Tbilisi fajı ile lizis ve A ve M monospesifik serumlar ile aglütinasyon testleri kullanılarak izole edilen suşlar biyotiplendirildi. Kısaca kurşun asetatlı kağıt şeritler besiyerine temas etmeyecek şekilde 2 set vida kapaklı şişelere kondu. Birinci tüpler %5-10

CO₂ içeren etüvde, diğerleri ise aerob koşullarda 37°C'de, 4 gün süreyle inkübe edildiler. İnkubasyon süresi sonunda sonuçlar, üreme durumlarına ve kurşun asetatlı kağıtlarda oluşan renk değişikliğine göre değerlendirildi. İnkubasyon süresinin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplandı ve yaklaşık 1X10⁹/ml bakteri bulunacak şekilde suspansiyon hazırlandı. Her bir bakteri suspansiyonundan steril bir svab ile test ve kontrol suşlarının tiyonin ve bazik fuksinin 1/50.000 (20µg/ml) konsantrasyonunu içeren TSA'lara şerit halinde ekimleri yapıldı. Aynı solüsyondan TSA ağara şerit halinde ekilen test suşlarının ortasına rutin test dilüsyonundaki (RTD) Tbilisi fajından 20 µl ekildi ve sonuçlar oluşan lizis durumuna göre değerlendirildi. Üreyen suşlardan alınan bir öze dolusu mikroorganizma bir damla FTS içinde süspanse edildikten sonra A ve M monospesifik anti-serumlar ile karıştırıldılar. Sonuçlar aglütinasyon durumuna göre değerlendirildi.

LAMP Testi: Bu aşamada klinik materyallerden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilerek, LAMP yönteminde kullanıldı.

Genomik DNA ekstraksiyonu: Bu aşamada klinik örneklerden DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Bu çalışmada Ohtsuki ve ark. (12) bildirdiği *Brucella* BCSP31 genine özgü LAMP primerleri kullanıldı.

External EP primerleri (F3 ve B3)

B3 5'-GCTCATCCAGCGAAACGC-3'

F3 5'-GCTTTACGCAGTCAGACGT-3'

Internal IP primerleri (FiP ve BiP)

FIP 5'-

AGGCGCAAATCTTCCACCTTGCGCCTATT-GGCCTATAACGG-3'

BIP 5'-

GGCGACGCTTTACCCGGAAATTCAGGT-
CTGCGACCGAT-3'

Loop LP primerleri (FITC ve Biotin ile işaretli)

Loop F 5'- CCTTGCCATCATAAAGGCC-3'

Loop R 5'- CGTAAGGATGCAAACATCAA-3'

LAMP reaksiyon şartları: Ohtsuki ve ark. (12) bildirilen yöntemine göre yapıldı. LAMP yöntemi 25 µl hacimde yapıldı. Reaksiyon karışımı; 40 pmol Internal IP primerler (FiP ve BiP), 5 pmol (F3 ve B3), 20 pmol (LF ve LB), 14 mmol deoxynucleoside triphosphates, 0.8 mol betain, 20 mmol Tris-HCl, 10 mmol KCl, 10 mmol (NH₄)₂SO₄, 8 mmol MgSO₄, 1% Tween 20, 8 ünite Bst DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 2 µl template DNA'dan oluştu. Reaksiyon karışımı 63 °C 'de 35 dakika thermal cycles (Thermo, Arktik)'da inkübe edildi ve son aşamada 95 °C'de 2 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı.

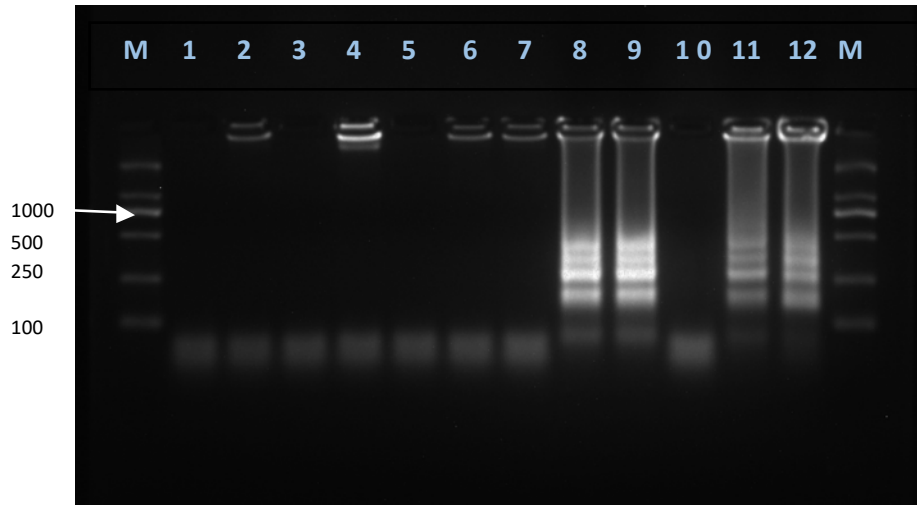
Agaroz jel elektroforezi: Oluşan LAMP ürünlerinin görüntülenmesinde % 2'lik agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Sonuçlar UV ışık altında incelendi.

BULGULAR

Bu çalışmada bruselloz yönünden şüpheli hayvanlardan alınan 20 adet süt ve 37 adet aborte fötüs materyali incelendi. İncelenen süt örneklerinin 5'inde ve abort materyalinin 8'inde LAMP testiyle pozitiflik saptanırken kültür yoluyla süt numunelerinden 4 ve abort materyallerinden 6 *B. abortus* biyotip 3 identifiye edildi. (Tablo 1, Şekil 1). Test örneklerinden 10 adedi her iki yöntemle pozitif bulunurken, 3 süt numunesi kültür yöntemi ile negatif bulunurken LAMP yöntemi ile pozitif olarak saptandı. Kültür yoluyla izole edilen *Brucella* suşlarının yapılan tiplendirilmesinde tümünün *B. abortus* biyotip 3 olduğu saptandı.

Tablo 1. Klinik örneklerden *Brucella* etkenlerinin izolasyonu ve LAMP sonuçları

Örnek (n)	LAMP pozitif		LAMP negatif		Kültür pozitif		Kültür negatif	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Süt (20)	5	25	15	75	4	20	16	80
Abort materyali (37)	8	21,6	29	78,4	6	16,2	31	83,8
Toplam (57)	13	22,8	45	77,2	10	17,5	47	82,5



Şekil 1. LAMP testi agaroz jel elektroforez görüntüsü, M: Marker (GelPilot Mid Range Ladder, Qiagen), 1-7, 10 Negatif; 8, 9, 11, 12 Pozitif.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bruselloz dünyanın özellikle gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerinde görülen en önemli zoonotik infeksiyonlarından biridir (2). Hastalığın teşhisinde altın standart kültür yöntemidir (3, 12). Ancak kültür yöntemi ile sonuç alınması uzun zaman ve uzmanlık gerektirmekte ve laboratuvar personeli için risk yaratabilmektedir. Etkenin varlığını tespit etmek için nested PCR, multiplex PCR ve Real time PCR gibi çeşitli PCR tabanlı moleküler metotlar kullanılmakla birlikte bu yöntemler, LAMP yöntemine göre daha fazla sarf malzeme kullanımına ve termocycler gibi özel ekipmanlara ihtiyaç duymakta, dolayısıyla daha yüksek maliyet gerektirmektedir. Kullanılan malzemelerin azlığından dolayı LAMP yönteminin maliyeti düşüktür ve hastalığı daha kısa sürede teşhis eden bir yöntemdir (13, 14).

Bu çalışmada bruselloz şüpheli hayvanlardan alınan 20 adet süt 37 adet abort materyalinden brusellozun teşhisi amacıyla LAMP testi kullanıldı. İncelenen materyallerin 13'ü (%22,8) LAMP ile pozitif bulunurken, kültür yöntemi ile örneklerin 10'undan (%17,5) *B. abortus* biyotip 3 izole ve tanımlendi. Yirmi süt örneğinin 5'i (%25) LAMP ile pozitif bulunurken kültürle pozitif bulunan numune sayısı 4 (%20) oldu. Abort materyallerinden 8'i (%21,6) LAMP ile pozitif bulunurken bakteriyel kültür sonucu 6 (%16,2) numune pozitif bulundu. Perez-Sancho ve ark. (15), 14 süt numunesini inceledikleri çalışmada, süt numunelerinin 12'sini, hem LAMP hem de kültür yöntemiyle pozitif bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada 17 aborte fötüs materyalini inceledikleri çalışmada 14 numuneyi kültür, LAMP ve RT-PCR ile pozitif bulmuşlar ve üç testin benzer sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Karthik ve ark. (16) 200 kan örneği ve 10 abort materyalini LAMP ve PCR ile inceledikleri çalışmalarında kan örneklerinden 12'sini LAMP, 11'ini de PCR ile pozitif bulurken, abort materyallerinden 5'ini hem PCR ile hem de LAMP ile pozitif olarak bulmuşlardır. LAMP

testinin klinik sensitivite ve spesifitesini Rose bengal ve Tüp aglütinasyon testiyle karşılaştırdıklarında % 100 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada diğer çalışmalara (15, 16) benzer bulgular elde edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda 3 adet kültür negatif örnek, LAMP testinde pozitif olarak bulunmuştur. LAMP tekniğinin daha fazla pozitif saptamasının nedeninin antibiyotik kullanımı, örneklerin uygun olarak laboratuvara ulaştırılmamış olması ve örneklerde canlı bakteri olmaması gibi kültür duyarlılığını azaltan bazı faktörlere bağlı olabileceği düşünülmüştür. Batinga ve ark. (17) 57 köpekten aldıkları kan moleküler olarak inceledikleri çalışmada, kültür, PCR ve LAMP testi pozitif oranlarını sırasıyla % 31.57, % 33.34, %14.03 olarak bulmuşlardır. LAMP testinin köpek brusellozunun teşhisinde sensitivitesinin düşük olduğundan dolayı başarılı bulunmuşlardır.

Araştırmacıların kültür duyarlılığını bizim çalışmamıza göre daha düşük bulmalarının nedeni çalışmalarında PCR'da IS711 insersiyon sekansını hedef alan primer kullanmalarından kaynaklanabilir. *B. abortus* spesifik LAMP testi geliştirilen başka bir çalışmada, 26 klinik örneğin 19'undan LAMP testiyle *B. abortus* saptanmıştır. Ancak, 3 örnek PCR ve kültürde pozitif olmasına rağmen LAMP testinde negatif bulunmuştur. Araştırmacılar bu örneklerin LAMP negatif olarak görülmesinin, PCR inhibitörleri, polimeraz aktivitesinin sensitivitesi ve konak genomik DNA'sının fazla miktarda bulunmasından kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir (18).

Sonuç olarak, LAMP yönteminin, pahalı ekipman gerektirmeden kısa sürede sonuçlar veren, hızlı ve oldukça duyarlı, spesifik bir test olarak brusellozun teşhisinde kullanılabileceği, LAMP testiyle beraber kültür yönteminin uygulanmasının teşhis sensitivitesinin artırılmasında yararlı olduğu, LAMP testinin spesifite ve sensitivitesinin yüksek olmasına rağmen hala kültür yönteminin altın standart olarak geçerliliğini sürdürdüğü kanısına varıldı. Ayrıca

brusellozun tanısının diğer moleküler yöntemlere göre daha kısa sürede konulmasıyla gerekli kontrol tedbirlerinin daha çabuk alınabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma HÜBAK tarafından 16215 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Corbel MJ. (1997). Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. 3(2): 213-221.
2. Blasco JM. (1990). *Brucella Ovis*. In: Animal Brucellosis. Nielsen K, Duncan JR, (eds). pp. 351–378. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
3. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. (1988). Techniques for The Brucellosis Laboratory. I.N.R.A, Paris, France.
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. (2000). Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28(12): e63.
5. Song L, Li J, Hou S, Li X, Chen S. (2012). Establishment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Rapid Detection of *Brucella spp.* and Application to Milk and Blood Samples. J Microbiol Methods. 90: 292-297.
6. Lin GZ, Zheng FY, Zhou JZ, et al (2011). Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting the omp25 Gene for Rapid Detection of *Brucella spp.* Mol Cell Probes. 25: 126-129.
7. Misawa Y, Yoshida A, Saito R, et al. (2007). Application of Loop-mediated Isothermal Amplification Technique to Rapid and Direct Detection of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Blood Cultures. J Infect Chemother. 13(3): 134-140.
8. Tao ZY, Zhou HY, Xia H, Xu S, Zhu HW. (2011). Adaptation of a Visualized Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique for Field Detection of *Plasmodium vivax* Infection. Parasites Vect. 4(1): 115.
9. Wang L, Li Y, Chu J, Xu Z, Zhong Q. (2010). Development and Application of a Simple Loop-mediated Isothermal Amplification Method on Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* strains. Molecular Biol Reports. 39(1): 445-449.
10. Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, et al. (2008). Development and Evaluation of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Simple Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Med Microbiol. 57(4): 444-451.
11. OIE (2009). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth Edition, Caprine and Ovine Brucellosis. Pp.1022-1030.
12. Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. (2008). Rapid Detection of *Brucella spp.* by the Loop-mediated Isothermal Amplification Method. J Appl Microbiol. 104(6): 1815-1823.
13. Mori Y, Notomi T. (2009). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Accurate, and Cost-effective Diagnostic Method for Infectious Diseases. J Infect Chemother. 15: 62–69.
14. Saharan P, Dhingolia S, Khatri P, Duhan JS, Gahlawat SK. (2014). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Based Detection of Bacteria: A review. Afr J Biotechnol. 13(9): 1920-1928.
15. Pérez-Sancho M, García-Seco T, Arrogante L, et al. (2013). Development and Evaluation of an IS711-based Loop-mediated Isothermal Amplification Method (LAMP) for Detection of *Brucella spp.* on Clinical Samples. Res Vet Sci. 95(2), 489-494.
16. Karthik K, Rathore R, Thomas P, et al. (2014). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Test for Specific and Rapid Detection of *Brucella abortus* in Cattle. Vet Q. 34 (4): 174-179.
17. Batinga MC, de Lima JTR, Gregori F, et al. (2018). Comparative Application of Is711-Based Polymerase Chain Reaction (PCR) and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Canine Brucellosis Diagnosis. Molecular and Cellular Probes Mol Cell Probes. 39:1-6
18. Kang SI, Her M, Kim YJ, et al. (2015). Rapid and Specific Identification of *Brucella abortus* Using the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 40: 1-6.

Yazışma Adresi:

* Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Şanlıurfa, TÜRKİYE
e-mail: serdenlig@harran.edu.tr
Telefon: 0 414 318 38 96
Faks: 0 414 318 39 21