

Parazitolojide Te his Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler

Zuhal B K N, Alparslan YILDIRIM, Abdullah NC , Önder DÜZLÜ
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

Özet: Moleküler biyolojideki ilerlemeler, yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren yeni te his metotlarının geli tirilmesine olanak sa lamı tır. Moleküler te his metotlarının parazitoloji alanında da uygulanması gecikmemi , ba ta PCR olmak üzere, çe itli moleküler metotların parazitolojide uygulanması ile çok sayıda türün kesin te hisi mümkün olmu , hatta yeni türlerin varlı ı ortaya konmu tur. Bu teknikler, veteriner parazitolojide sistematik, populasyon geneti i, biyoco rafya ve ekoloji gibi konularda uygulanmı tır. Tanı veya ara tırma amacıyla kullanılan moleküler teknikler, nükleik asitler ve protein belirlenmesinde kullanımlarına göre ikiye ayrılarak incelenir. Bu derlemede parazitoloji alanın- da sık olarak kullanılan moleküler teknikler özet olarak verilmi tır.

Anahtar Kelimeler: Moleküler biyoloji, te his, veteriner parazitoloji

Molecular Biological Techniques used for Diagnosis in Parasitology

Summary: Advances in molecular biology have allowed the development of new diagnostic methods with high specificity and sensitivity. Also, the implementation of molecular diagnostic techniques in the field of parasitology is not delayed. The definitive diagnosis of several species and even the exhibition of the presence of new species have been possible by using of a variety of molecular methods, particularly PCR in parasitology. These techniques have been applied in several areas such as systematic, population genetics, biogeography and ecology in veterinary parasitology. Molecular techniques used for diagnosis or research purposes are classified into two groups according to their use in proteomics or in nucleic acids.

Key Words: Diagnosis, molecular biology, veterinary parasitology

Giri

Parazitler insan sa lı nı , hem hastalıklara neden olarak do rudan hem de insanlar için önemli besin kayna ı olan hayvanlarda verim kayıplarına yol açarak dolaylı olarak etkiler. Son 20 yılda moleküler biyolojide kaydedilen geli meler, veteriner parazitolojide de önemli uygulama alanları bulmu tur. Moleküler biyolojideki bu geli meler, paraziter hastalıkların kontrolü için yeni yakla ımların ortaya konmasını sa lamı tır (12). Biyoteknolojide meydana gelen geli meler moleküler tekniklerin parazitoloji alanında da kullanılmasını sa lamı tır. Konvansiyonel olarak parazitlerin ayırımı ve tanımlanmaları, genellikle morfolojik yapıları, konak spesifiteleri, ta ınma ekilleri, patolojik etkileri ve co rafik orijinlerine göre yapılmaktadır. Ancak bu özellikler, parazitleri tür düzeyinde ayırmada ço unlukla yetersiz kalmaktadır. Moleküler parazitolojideki geli meler, özellikle nükleik asit tabanlı teknikler, özgüllü ü ve duyarlılı ı artıran güçlü alternatif tanı araçları sunmu tur (30). Bu teknikler, veteriner parazitolojide tanı, tedavi, genetik tipendirme, sistematik (taksonomi ve filogeni), populasyon geneti i, ekoloji, epidemiyoloji, antiparazitik ilaç ve a ı geli tirilmesi, ilaç direncinin anlaşılması ve parazit genom çalı maları gibi ko-

nularda uygulama alanı bulmu tur (12, 16, 21, 31, 35).

Moleküler biyolojide kullanılan nükleik asit tabanlı tekniklerden DNA'yı tespit etmede standart polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), multipleks PCR, nested PCR, in situ PCR, arbitrary-primed PCR (AP-PCR), reverse line blotting (RLB), gerçek zamanlı (real-time) PCR (qPCR), polimeraz zincir reaksiyonu-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), southern blotting; RNA için reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ve northern blotting; protein ara tırmalarında ise western blotting gibi teknikler kullanılmaktadır (33).

DNA Tabanlı Teknikler

Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

PCR, bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak in vitro olarak ço altılmasını (amplifikasyonunu) sa layan oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir (34). Bu yöntem, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin ba lanması ve uzaması esasına dayanır (35). Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli

DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit organik bazın bulunduğu deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmektedir. Bir PCR döngüsü DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi (denatürasyon), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç aşamadan oluşur. PCR reaksiyonu, araştırılacak örnekteki DNA'nın çift zincirli yapısı yüksek ısı (94-97 °C, 15-60 sn) yardımıyla birbirinden ayrılır (denatürasyon). Daha sonra düşük ısılarda (50-65 °C, 30-60 sn) sentetik oligonükleotid primerler, ayrılması olan tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül bölgelere bağlanırlar (annealing/hibridizasyon). Isı 72 °C'ye kadar artırılarak DNA polimeraz enziminin DNA zincirini uzatması sağlanır (elongasyon/uzama) (35). Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar. Sentezlenen DNA ürününün saptanması, kopyaları çıkarılan primerler arasında kalan belli baz çifti büyüklüğündeki bölgenin jel üzerinde veya amplifikasyon yapılan bölgeye uygun tamamlayıcı prob ile hibridizasyon sonrası belirlenmesi ile gerçekleştirilir (30).

PCR yönteminde temel bileşenler; kalıp DNA, kalıp DNA'nın dizilerini tamamlayan tek zincirli oligonükleotidler (primerler), deoksiribonükleotid trifosfat (dNTPler), tampon, MgCl₂ ve ısıya dayanıklı DNA polimerazdır. En çok kullanılan DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adı verilen termofilik bakteriden izole edilir ki buna Taq DNA polimeraz adı verilir (40).

Parazitoloji alanında, Akta ve ark. (1) Elazığ bölgesinde koyun ve keçilerde *Theileria* enfeksiyonunu belirlemek amacıyla PCR yöntemini kullanmışlar ve Elazığ bölgesinde yaygın türün *T.ovis* olduğunu ve bu yöntemin portör hayvanların tespitinde mikroskopik bakıya göre daha avantajlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Aparecida ve ark. (3) bir çok ülkede köpeklerde visceral leishmaniasis nedeni olan *Leishmania chagasi* ve *L. braziliensis*'i PCR yöntemi ile inceleyerek hastalığın tedavisinde bu yöntemin oldukça spesifik olduğunu kaydetmişlerdir.

Multipleks PCR: ki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesine dayanır. Multipleks PCR, enfeksiyon hastalıkları alanında virüs, bakteri

ve parazitlerin identifikasyonunda kullanılır. Multipleks PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanılan bir inceleme yöntemidir (28).

Alhassan ve ark. (2) *Babesia caballi* ve *B. equi*'nin eş zamanlı tedavisinde 18S ribozomal RNA genlerini hedefleyen multiplex PCR kullanmışlar ve bu yöntemin söz konusu enfeksiyonlara yönelik epidemiyolojik çalışmalarında, rutin laboratuvar tedavislerinde basit ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Magalhaes ve ark. (27) *Fasciola hepatica*'nın tedavisine yönelik olarak ara konakları olan su sümüklülerinde klasik histolojik kesitler ile larval dönemlerin morfolojik yapılarına göre tedavislerinin oldukça zor olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sorunların önlenmesinde ITS geninin farklı bölgelerini çoğaltan multipleks PCR yönteminin yüksek duyarlılıkta tedavise imkan sağladığını belirlemişlerdir (27).

Nested PCR: Nested PCR, özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgünlükte bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde ardarda iki PCR yapılır ve iki çift primer kullanılır. İlk PCR çoğaltılmak üzere ara tırılan etken için genel bölgelerin amplifikasyonuna yöneliktir. İkinci PCR ise ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren, tür veya su spesifik nested primerleri ile yapılır (48).

Saito-Ito ve ark. (37) sahadan topladıkları kan emmemi *Ixodes ovatus*'ların tükürük bezlerinde nested-PCR yöntemi ile *Babesia microti* DNA'sını saptamışlardır. Sungur ve ark. (41) diğeri kıda *Cryptosporidium* türlerinin tedavise için nested PCR yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemin kulu ishal olgularında, cryptosporidiosis etiyojisinin ortaya konması açısından uygun bir yöntem olduğunu göstermişlerdir.

In Situ PCR: Lam üzerindeki hücre, doku ya da doku parçaları içindeki kalıp DNA'nın PCR ile çoğaltılması ile in situ PCR adı verilir. Bu yöntem viral DNA'nın ve tek kopyalı genlerin saptanmasında veya reverse transkriptaz PCR ile birlikte viral RNA ve transkriptlerin belirlenmesinde kullanılır. In situ PCR, hücre içine PCR bileşenlerinin girilmesine izin vermek üzere hücre membranları yarı geçirgen hale getirildikten sonra fikse edilmiş hücre veya dokularla yapılır (44).

Löschenberger ve ark. (26) *Neospora caninum* ile enfekte köpeklerin beyin, karaciğer, böbrek ve kalp dokularından alınan örnekleri indirek in situ PCR ile inceleyerek bu yöntemin standart PCR'dan daha sensitif ve spesifik olduğunu kanıtlamışlardır. Gookin ve ark. (14), *Tritrichomonas foetus* 18S

rRNA bölgesinden dizayn ettikleri tür spesifik oligonükleotid dizisi ile histolojik kesitlerde uyguladıkları in situ hibridizasyonda, testin duyarlılığının ve özgüllüğünü oldukça yüksek belirlemiştir. Bu yöntemin özellikle memelilerde dokulara yerleşen diere Tricomonadların ayırıcı testinde başarı ile kullanılabilmesini bildirmiştir (14).

Arbitrary-primed PCR (AP-PCR): Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR) olarak da adlandırılan arbitrary-primed PCR, rastgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu olup, nükleotid dizisi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar (47). Polimorfizmin belirlenmesi genetik testlerin (markır) elde edilmesinde ve genetik harita yapımında kullanılır (43). Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA'nın temeli yaklaşık 10 nükleotidlik ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş bir veya birkaç primer ile çoğaltılması esasına dayanır. Kullanılan primerler G-C bakımından zengindir. PCR ile elde edilen ürünlerin jel elektroforezi ile analizi sonucu meydana gelen bantların profillerinin benzerlik/benzersizlik dereceleri belirlenerek polimorfizm hakkında bilgi edinilir (43).

Intapan ve ark. (18) *Paragonimus*'un 5 türünü (*Paragonimus heterotremus*, *P. siamensis*, *P. harinasutai*, *P. westermanni* ve *P. bangkokensis*) ayırt etmek için RAPD-PCR markırlarını kullanarak bu markırların *Paragonimus heterotremus*'un ikisi arasında farklı olabileceğini ve filogenetik analizleri sonucu *Paragonimus heterotremus*'a genetik olarak en yakın *P. harinasutai* olduğunu bunu *P. siamensis*, *P. bangkokensis* ve *P. westermanni*'nin izlediğini kaydetmiştir.

Touchdown PCR: Touchdown PCR, dejener primerlerin nonspesifik bağlanmasını önleyen ve primerlerin bağlanma ısısını belirleyen özel bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde, bağlanma sıcaklığı döngüler arasında 1-2 °C düşürülerek uygun sıcaklık derecesini belirlenmekte ve bu sıcaklıkta kalan amplifikasyon döngüleri tamamlanmaktadır (10). Suzuki ve ark. (42) farelerde yaptıkları bir çalışmada *Schistosoma mansoni* enfeksiyonunun erken tanısında PCR yöntemi ile ortaya çıkan nonspesifik bantların oluşmasını engellemek amacıyla touchdown PCR'ı kullanarak bu yöntemin amplifikasyon boyunca nonspesifik bantların oluşmasını engellediğini göstermiştir.

Revers line blotting (RLB): Farklı cins ve türlere ait etkenlerin eş zamanlı olarak tanı ve ayırımı için geliştirilen bir tekniktir (6). Reverse line blotting tekniği, 18S ve/veya 16S rDNA bölgelerinin amplifikasyonu ve elde edilen ampliconların daha önceden bir membrana kovalent olarak bağlanmasını

tür spesifik problemlerle hibridizasyonu esasına dayanır. Problemler membranda farklı sıralara dizilimi olup, her bir ampliconun aynı anda tüm problemlerle karşılaştırılması yönüyle de birden fazla etkenle eş zamanlı tanısını ve ayırımını sağlar (6).

Çağ ve ark. (20) Kayseri'de sırtırlardan toplanan kene örneklerinde PCR-RLB tekniği ile *B. bigemina*, *T. annulata* ve *Babesia* spp. pozitifliği saptamıştır. İonita ve ark. (19) atlarda küçük strongilleri ivermektin tedavisi öncesinde ve sonrasında RLB yöntemi ile inceleyerek strongillerden (*Cylicocycylus nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicostephanus calicatus*, *Cylicostephanus minutus*) ivermektine dirençli olan strongil türlerini belirlemiştir.

Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR (qPCR): Gerçek zamanlı PCR, PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan testlerle ilgili prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluştuğu DNA ile doğru orantılı olarak arttıran bir çoğaltma yöntemidir (23). Yöntemin biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme, tek nokta mutasyonlarını, patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP (single nucleotid polymorphism) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda kullanım alanları bulunmaktadır (25). Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında SYBR Green I ve etidyum bromid boyaları, DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi, özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli problemler kullanılır (25). Bu tekniklerin yanında TaqMan prob, molecular beacon, fluorescence resonance energy transfer (FRET), hibridizasyon prob ve Scorpion primer gibi floresan işaretli problemler kullanılarak yapılanlar gelmektedir (25).

Aydın ve ark. (4) gebe kadınlardan amniyon sıvısı ve yenidoğan bebeklerden beyin omirilik sıvılarını (BOS) gerçek zamanlı PCR ile incelemişler ve *T. gondii* enfeksiyonunu saptayarak, gerçek zamanlı PCR uygulamasının duyarlı, spesifik ve detektif vücut sıvıları ile doku örneklerinden DNA izolasyonunu sağlayan, yeni geliştirilen bir tanı yöntemi olduğunu bildirmiştir. Thanchomnang ve ark. (45) köpeklerde ve vektör sivrisineklerde *Dirofilaria immitis*'i incelemek amacıyla gerçek zamanlı PCR'ı kullanarak bu yöntemin hastalığın epidemiyolojik incelenmesi ve testinde oldukça özel ve duyarlı bir yöntem olduğunu bildirmiştir. Li ve ark. (24) *Hepatozoon* türlerinin 18S rRNA genini amplifiye ederek gerçek zamanlı PCR ile inceleyerek bu yöntemin hastalığın testinde uygun olduğunu göstermiştir.

Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP):

Restriksiyon enzimleri (RE), çift iplikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin fonksiyonları olan enzimlerdir (49). Bu yöntemde öncelikle genomik DNA spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmaktadır. Yöntem PCR'de elde edilen ürünleri bir veya daha fazla sayıda restriksiyon enzimi ile keserek elde edilen kesim ürünlerinin etidium bromid ilave edilerek hazırlanmış agaroz jel elektroforezi ile belirlenmesi esasına dayanır (49).

Rozenzvit ve ark. (36) *Echinococcus granulosus*'ün epidemiyolojisi ve genetik çeşitliliğini incelemek amacıyla PCR-RFLP yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemle *Echinococcus granulosus*'ün dört farklı suşu (G1, G2, G6, G7) olduğunu belirlemişlerdir. Otranto ve ark. (32), *Hypoderma bovis* ve *H. lineatum*'ün sitokrom oksidaz I (COI) gen bölgesini üç farklı restriksiyon enzimi ile keserek yaptıkları PCR-RFLP çalışmaları sonunda bu gen bölgesinin her iki tür için farklı olduğunu ve PCR-RFLP yönteminin hastalığın epidemiyolojisi ve tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Southern Blotting: Southern tarafından 1975 yılında tanımlanan bu teknik, istenilen DNA parçasının ona tamamlayıcı olan radyoaktif veya radyoaktif olmayan belirleyicilerle etiketlenmiş problemler kullanılarak melezlenmesine ve melezlemenin ardından belirleyicinin özelliğine göre radyoaktif, immünojenik, kimyasal ya da floresan yöntemlerle görünür hale getirilmesi esasına dayanmaktadır (43). Bu metotta, öncelikle çalışılan DNA'nın izolasyonu ve elde edilen genomik DNA restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılmaktadır. Bu işlemi takiben oluşan DNA parçaları, elektriksel ortamda agaroz jel üzerinde uzunluklarına göre göç ettirilmiştir (43). Daha sonra jeldeki DNA'lar nitroselüloz membran gibi bir destek membrana aktarılmakta (blotlama) ve en son olarak DNA dizimlerinin yerini etiketli DNA problemleri kullanılarak belirlenmektedir (görüntüleme) (43). Campos-Gongora ve ark. (8) *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba*'nin diğer türlerinin kist duvarı oluşumunda görev yapan kitin sentezinin genetik yapısının belirlenmesi amacıyla, Genest ve ark. (13) ise *Leishmania* genomunda J bölgesinin telomerik yerleşiminin ve fonksiyonunun belirlenmesinde southern blotting yöntemini kullanmışlardır.

RNA Tabanlı Teknikler

Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR): Reverse Transkriptaz PCR tekniği, RNA'dan tamamlayıcı

DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması şeklinde iki aşamadan oluşur. Yöntem az sayıdaki doku örneklerinde düşük miktarlardaki mRNA'nın incelenmesini sağlayan çok duyarlı bir tekniktir (43). Reverse Transkriptaz PCR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında oldukça duyarlı bir yöntemdir (43).

Bu yöntem *Echinococcus* türlerinin gen ekspresyon çalışmaları ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır (22). Babiker ve ark. (5) insan malarya paraziti olan *Plasmodium falciparum*'un olgun gametositlerini RT-PCR ile inceleyerek bu yöntemin çok düşük miktarlardaki gametositlerin tespiti için uygun bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Northern Blotting: Northern melezleme olarak adlandırılan bu yöntemde önce toplam RNA agaroz jelde yürütülerek RNA moleküllerinin ayrılması sağlanır. Daha sonra jelde ayrılmış RNA moleküllerinin bir membrana aktarılması sağlanır (43). RNA'nın membran üzerine sabit şekilde bağlanması sağlandıktan sonra uygun problemlerle melezleme işlemi gerçekleştirilir. Northern blotting, RNA'nın izolasyonu, elektroforezi, membrana transferi, etiketli DNA/RNA problemlerle hibridizasyon ve otoradyografiyle görüntüleme olmak üzere toplam beş aşamada uygulanmaktadır (43). Southern blotting'den farklı olarak RNA'ların RE'lerle kesimi olmadığından daha ekonomik ve hızlı bir yöntemdir (43). Siles-Lucas ve ark. (39) northern blotting yöntemini kullanarak *E. granulosus* ve *E. multilocularis* metastodlarında tümör benzeri büyümeden sorumlu 14-3-3 protein gen ekspresyonlarının karşılaştırılması yaparak bu proteinin her iki türde farklı olduğunu sonucuna varmışlardır. Homwutthiwong ve ark. (17) *Fasciola gigantica*'nın vitellin B proteinlerinin genetik yapısının belirlenmesi amacıyla bu yöntemi kullanmışlar ve yetmiş iki bir parazitteki vitellin B proteininin 1.000 nükleotid uzunluğunda olduğunu göstermişlerdir.

Protein Tabanlı Teknikler

Western Blotting: Western blotting (immunoblotting), poliakrilamid jel elektroforezi ile moleküler büyüklüklerine göre ayrı tırılan proteinlerin destek membrana aktarılması ve membrandaki proteinlerin immünojenik metodlarla gösterilmesi esasına dayanan bir blotting yöntemidir (46). Western blotting tekniği elektroforez işlemi takip eden dört adımda gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engelle-

mek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamı bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi amaçlarıdır (15). Western blotting yöntemi parazitoloji alanında proteinlerin belirlenmesi, monoklonal ve poliklonal antikorların özelliklerinin incelenmesi ve parazit antijenlerine karşı oluşturulan antikor yanıtının saptanmasında kullanılmaktadır (33). Bu teknik yalnızca pozitiflik oranının düşük olması, enfeksiyon etkeninin seçilmiş proteinine karşı oluşan immün yanıtı belirleyerek hastalığın prognozu hakkında fikir vermesi gibi avantajlara sahiptir (33). Gallego-Marin ve ark. (11) Kolombiya'da yeni doğmuş bebeklerden aldıkları serum örneklerini konjenital *T. gondii* yönünden incelemek amacıyla western blotting yöntemini kullanmışlar ve Kolombiyada yeni doğan bebeklerde *Toxoplasma* enfeksiyonunun prevalansının yüksek olduğunu göstermişlerdir. Boldbaatar ve ark. (7) sırtlarında *Hypoderma lineatum*'un antikorunu bulmak amacıyla hipodermis C antijenini kullanarak western blotting yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemin

sırtlarında hipodermis C antijenini belirlemek için uygun bir yöntem olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

DNA Dizi Analizi (Sekans): Etken DNA'sının belirli bir bölgesinin nükleotid dizilerinin saptanmasında geliştirilen bir tekniktir. DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır (31). Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve ark. (38)'nin geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotid dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2,3'-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert (29) ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayırım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve dehidroliz etme amaçlı son derece uzun bir yöntemdir. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (31).

Tablo 1: Türkiye'nin çeşitli yörelerinde bazı parazitlere yönelik yapılan sekans sonuçları

Parazit Türü	Konak	Yöre	Gen Bölgesi	GenBank: Aksesyon Numarası
<i>Theileria annulata</i>	Sırt	Elazığ	Small subunit ribozomal RNA	AY508463
<i>Plasmodium vivax</i>	-	Adana	Merozoit yüzey protein geni	AJ494832
<i>Babesia bovis</i>	Sırt	-	18S ribosomal RNA	EF458209
<i>Babesia bigemina</i>	Sırt	Giresun	18S ribosomal RNA	EU622822
<i>Babesia ovis</i>	Koyun	Elazığ	18S ribosomal RNA	EF194112
<i>Babesia canis vogeli</i>	Köpek	İstanbul	18S ribosomal RNA	AM183216
<i>Babesia major</i>	Sırt	Tokat	18S ribosomal RNA	EU622825
<i>Theileria ovis</i>	Keçi	-	18S ribosomal RNA	EF092453
<i>Theileria orientalis</i>	Sırt	Amasya	18S ribosomal RNA	EU622821
<i>Theileria annulata</i>	Sırt	Amasya	18S ribosomal RNA	EU622823
<i>Taenia polyacantha</i>	Tarla faresi	-	NADH dehidrogenaz subunit 1	EU544634
<i>Taenia multiceps</i>	Koyun	Niğde	Sitokrom oksidaz subunit I	EF393620
<i>Echinococcus granulosus</i>	insan	-	Sitokrom oksidaz subunit I	GU951512
<i>Fasciola gigantica</i>	Sırt	Elazığ	Sitokrom oksidaz subunit I	GQ121277
<i>Fasciola hepatica</i>	Sırt	Erzurum	Sitokrom oksidaz subunit I	GQ121276

Tablo 2: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı sekans sonuçları

Parazit Türü	Konak	Yöre	Gen Bölgesi	GenBank: Aksesyon numarası	Sekans Sayısı
<i>T. ovis</i>	Koyun	Kayseri	18S ribosomal RNA	HM241892-4	3
	Keçi	Kahramanmaraş		HM241891	1
<i>T. annulata</i>	Sığır	Kayseri	18S ribosomal RNA	HQ197730-2	3
		Karabük		HQ197733	1
<i>T. orientalis</i>	Sığır	Karabük	18S ribosomal RNA	HQ197734-5	2
		Giresun		HQ197736	1
<i>B. bigemina</i>	Sığır	Kayseri	Small subunit ribosomal RNA	EF446164	1
		Kayseri	18S ribosomal RNA	HQ197737-9	3
		Çankırı	18S ribosomal RNA	HQ197740	1
		Karabük	18S ribosomal RNA	HQ197741	1
<i>B. ovis</i>	Keçi	Kahramanmaraş	18S ribosomal RNA	HM241887-0	4
<i>B. bovis</i>	Sığır	Aydın	Merozoite surface antigen 2c	HM117270	1
		Giresun		GU647154	1
		Samsun		GU647152-3	2
		Trabzon		GU647151	1
		Amasya		GU647150	1
		Bartın		GU647149	1
		Kastamonu		GU647148	1
		Karabük		GU647147	1
		Karabük		GU004533	1
Bolu	GU357634	1			
<i>Babesia</i> sp.	Kene	Kayseri	Small subunit ribosomal RNA	EF434786	1
<i>Dirofilaria immitis</i>	Sivrisinek	Kayseri	5.8S ribosomal RNA	HM126606-8	3
<i>Taenia multiceps</i>	Sığır	Erzurum	NADH dehidrogenaz subunit 1	HM143882-7	6
<i>Plasmodium</i> sp.	Sivrisinek	Kayseri	Sitokrom b geni	HQ677623-4	2

Türkiye'nin çe itli bölgelerinde (Tablo 1) ve Erciyes Üniversitesi (ERÜ) Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında (Tablo 2) çe itli parazitlere ait DNA dizi analizi çalı maları yapılmı tır.

Sonuç olarak, moleküler biyolojik tekniklerin geli mi veteriner parazitoloji sahasında helmint ve protozoon enfeksiyonlarının tanısı ba ta olmak üzere, parazitlerin hayat döngüleri ve patogenezi gibi bilinmeyen bazı hususların açıklanmasında uygulama alanı bulmu lardır (12). Yine bu yöntemler, bilinen mevcut parazitlerin alt tür ya da farklı genotipleri ile bugüne kadar bilinmeyen yeni parazit türlerinin tanımlanmalarına da önemli katkılar sa lamı tır (12).

Kaynaklar

1. Akta M, Dumanlı N, Altay T, 2005. Elazı yöresinde koyun ve keçilerde *Theileria ovis*'in polimeraz zincir reaksiyonu ile ara tırılması. *T Parazitol Derg*, 29 (1): 17-21.
2. Alhassan A, Pumidonming W, Okamura M, Hirata H, Battsetseg B, Fujisaki K, Yokoyama N, Igarashi I, 2005. [Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood.](#) *Vet Parasitol*, 129: 43-49.
3. Aparecida HS Gomes, Isabelle MR Ferreira, Maria LSR Lima, Elaine A Cunha, Andrea S Garcia, Maria FL Araújo, Vera L Pereira-Chiocola, 2007. [PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis.](#) *Vet Parasitol*, 144: 234-241.
4. Aydo an S, Do ruman ALF, Eren A, Kalkancı A, Ku timur S, Biri A, 2005. *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu tanısında iki türlü gerçek zamanlı (Real-Time) polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin kullanılması. *T Parazitol Derg*, 29 (2): 80-84.
5. Babiker HA, Abdel-Wahab A, Ahmed S, Suleiman S, Ranford-Cartwright L, Carter R, Walliker D, 1999. Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 99: 143-148.
6. Bilgin Z, 2007. Trakya'da Sı ırlarda Bulunan *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin ve Bunların Sı ırlarda Yaygınlığının Reverse Line Blotting (RLB) Tekni i ile Ara tırılması. Doktora Tezi. İstanbul Üniv Sa lık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
7. Boldbaatar D, Xuan X, Kimbita E, Huang X, Igarashi I, Byambaa B, Battsetseg B, Battur B, Battsetseg G, Batsukh Z, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T, 2001. [Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermis C antigen.](#) *Vet Parasitol*, 99: 147-154.
8. Campos-Gongora E, Ebert F, Willhoeft U, Said-Fernandez S, Tannich E, 2004. Characterization of Chitin Synthases from *Entamoeba*. *Protist Sep*, 155 (3): 323-30.
9. Dilsiz N, 2004. Moleküler Biyoloji. Palma Yayıncılık. Yayın No: 279, pp. 55-60.
10. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS, 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nuc Acids Res*, 19: 4008.
11. Gallego-Marin C, Henao AC, Gomez-Marin JE, 2005. Clinical validation of a Western blot assay for congenital toxoplasmosis and newborn screening in a hospital in Armenia (Quindio) Colombia. *J Trop Ped*, 52 (2): 107-112.
12. Gasser RB, 2006. Molecular tools advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol*, 136: 69-89.
13. Genest PA, Riet B, Cijssouw T, Luenen HGAM, Borst P, 2007. Telomeric localization of the modified DNA base J in the genome of the protozoan parasite *Leishmania*. *Nuc Acids Res*, 35 (7): 2116-2124.
14. Gookin JL, Stone MR, Yaeger MJ, Meyerholz DK, Moisan P, 2010. [Fluorescence in situ hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomonosis.](#) *Vet Parasitol*, 172 (1-2): 139-143.
15. Harper DR, Coles BF, 1996. Western (immuno) blotting and radioimmunoprecipitation. In: Mahy BWJ, Kangro HO (eds). *Virology methods manual*. Academic Press, San Diego, pp. 261-266.
16. Hodgkinson JE, 2006. Molecular diagnosis and equine parasitology. *Vet Parasitol*, 136: 109-16.
17. Homwutthiwong K, Meepool A, Grams R, Wanichanon C, Viyanant V, Sobhon P, 2009. Cloning, characterization and expression of vitelline protein BI and ITS encoding gen in the liver fluke, *Fasciola gigantica* Southeast Asian. *J Trop Med Pub Health*, 40 (2): 199-210.

18. Intapan PM, Kosuwan T, Wongkham C, Maleewong W, 2004. [Genomic characterization of lung flukes, *Paragonimus heterotremus*, *P. siamensis*, *P. harinasutai*, *P. westermani* and *P. bangkokensis* by RAPD markers.](#) *Vet Parasitol*, 124: 55-64.
19. Ionita M, Howe DK, Lyons ET, Tolliver SC, Kaplan RM, Mitrea IL, Yeargan M, 2010. [Use of a reverse line blot assay to survey small strongyle \(Strongylida: Cyathostominae\) populations in horses before and after treatment with ivermectin.](#) *Vet Parasitol*, 168: 332-337.
20. a A, Vatansever Z, Yıldırım A, Düzlü Ö, nci A, 2007. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. *Vet Parasitol*, 148: 156-160.
21. Klokouzas A, Shahi S, Hladky SB, Barrand MA, Van Veen HW, 2003. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *Inter J Antimicrob Agent*, 22: 301-317.
22. Konrad C, Kroner A, Spiliotis M, Zavala-Gongora R, Brehm K, 2003. Identification and molecular characterization of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int Jour For Parasitology*, 33: 301-12
23. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N, 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27: 95-125.
24. Li Y, Wang C, Allen KE, Little SE, Ahluwalia SK, Gao D, Macintire DK, Blagburn BL, Kalteneboeck B, 2008. [Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR.](#) *Vet Parasitol*, 157: 50-58.
25. Logan J, Edwards K, 2009. An overview of PCR platforms. In: Logan J, Edwards K, Saunders N eds, *Real Time PCR: Current technology and applications*. Caister Academic Pres; p 8.
26. Löschenberger K, Szölgvényi W, Peschke R, Prosl H, 2004. Detection of the protozoan *Neospora caninum* using in situ polymerase chain reaction. *Biotech Histochem*, 79 (2): 101-105.
27. Magalhaes KG, Jannotti-Passos LK, Caldeira RL, Aires Berne ME, Muller G, Carvalho OS, Lenzi HL, 2008. [Isolation and detection of *Fasciola hepatica* DNA in *Lymnaea viatrix* from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR.](#) *Vet Parasitol*, 152: 333-38.
28. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M, 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal*, 16: 47-51.
29. Maxam A, Gilbert W, 1977. A new method of sequencing DNA. *PNAS*, 74: 560-564.
30. McPherson MJ, Moller SG, 2000. *The Basics*. New York: Cromwell Press, 1-45.
31. Monis PT, Andrews RH, Saint CP, 2002. Molecular biology techniques in parasite ecology. *Int J Parasitol*, 32: 551-562.
32. Otranto D, Traversa D, Tarsitano E, Stevens J, 2003. [Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* \(Diptera, Oestridae\) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism \(PCR-RFLP\).](#) *Vet Parasitol*, 112 (3): 197-201.
33. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H, 2009. Moleküler Parazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derne i Yayınları, Yayın No:22.
34. Persing HD, 1991. Polymerase chain reaction: Trends to benches. *J Clin Microbiol*, 29: 1281-1285.
35. Prichard R, Tait A, 2001. The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol*, 98: 169-194.
36. Rozenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG, Guarnera EA, McManus DP, 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology*, 118 (5): 523-530.
37. Saito-Ito A, Yano Y, Dantrakool A, Hashimoto T, Takada N, 2004. Survey of rodents and ticks in human babesiosis emergence area in Japan: First detection of *Babesia microti*-like parasites in *Ixodes ovatus*. *J Clin Microbiol*, 42 (5): 2268-2270.
38. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS*, 74: 5463-5467.
39. Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A, 2001. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitol*, 122: 281-87.

40. Siqueira JF, Roças IN, 2003. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent*, 31 (5): 333-339.
41. Sungur T, Kar S, Güven E, Akta M, Karaer Z, Vatansever Z, 2008. *Cryptosporidium* spp'nin dışkıdan Nested PCR ve Carbol Fuchsin boyama ile teşhis edilmesi. *T Parazitol Derg*, 32 (4): 305-308.
42. Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Kanazawa T, 2006. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. *Parasitol Int*, 55: 213-218.
43. Temizkan G, Arda N, 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2.baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
44. Teo IA, Shaunak S, 1995. Polymerase chain reaction in situ: an appraisal of an emerging technique. *Histochem J*, 27(9): 647-659.
45. Thanchomnang T, Intapan PM, Lulitanond V, Sangmaneeet S, Chungpivat S, Taweethavonsawat P, Choochote W, Maleewong W, 2010. [Rapid detection of *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis.](#) *Vet Parasitol*, 168: 255-260.
46. Us D, 2006. Serolojik tanı yöntemleri uygulama ve değerlendirme. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Basımevi; s: 43-45.
47. Ütük AE, İmrek S, Köroğlu E, 2005. *Echinococcus* cinsinin moleküler genetik karakterizasyonu. *T Parazitol Derg*, 29 (3): 171-176.
48. Wikipedia Website: Nested polymerase chain reaction. Erişim: http://en.wikipedia.org/wiki/Nested_polymerase_chain_reaction. Erişim tarihi: 12.03.2010
49. Yabancı A, 2001. Restriction Length Fragment Polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyonu bazlı tiplendirme yöntemleri. Durmaz R (ed). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, s: 149-160.

Yazın Adresi:

Biyolog Zuhal B. K. N.
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı
Tel: 0352 3380006/125
e-mail: zuhalbiskin@mynet.com