

# *Theileria annulata* Tams1 Geninin PCR-RFLP Analizi

Kürşat ALTAY, Münir AKTAŞ, Nazir DUMANLI

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

**ÖZET:** Tams1, *Theileria annulata*'nın merozoit yüzey antijeni olup, bu antijendeki genetik farklılıklar ELISA gibi tanı amaçlı test geliştirme ve rekombinant aşı çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, Elazığ ve Bingöl illerinde, doğal enfekte sığırlardan elde edilen 89 *T. annulata* izolatının, Tams1 geninin PCR-RFLP analizi yapıldı. PCR-RFLP sonucunda, 6 farklı restriksiyon profili (a, b, c, d, e, f) tespit edildi. 89 örneğin restriksiyon profillerinin dağılımının 78(a), 2(b), 2(c), 5(d), 1(e), 1(f) olduğu belirlendi.

**Anahtar Sözcükler:** *Theileria annulata*, Tams1, PCR-RFLP.

## PCR-RFLP Analysis of the Tams1 Gene of *Theileria annulata*

**SUMMARY:** Tams1 is a merozoite surface antigen of *Theileria annulata*. Genetical variations of Tams1 make studies of vaccine and diagnostic tests like ELISA difficult. In this study, Tams1 genes of 89 *T. annulata* isolates obtained from natural infected cattle in Elazığ and Bingöl regions were tested with PCR-RFLP. Six different restriction profiles (a, b, c, d, e, f) were detected. The number of restriction profiles of 89 samples was found to be as follows: 78(a), 2(b), 2(c), 5(d), 1(e), and 1(f).

**Key Words:** *Theileria annulata*, Tams1, PCR-RFLP.

## GİRİŞ

*Theileria annulata* sığırların önemli bir protozoon paraziti olup, *Hyalomma* soyuna bağlı kene türleriyle nakledilmektedir. Parazitin sığırlarda sebep olduğu tropikal theileriosis, yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden bir enfeksiyon olup, Kuzey Afrika, Güney Avrupa ve Asya'da görülmekte ve 250 milyon sığırı tehdit etmektedir (14, 15). Hastalık Türkiye'nin hemen her bölgesinde bulunmakta ve sığır yetiştiriciliği için önemli bir problem oluşturmaktadır (1, 9, 11).

Tropikal theileriosiste kene mücadelesi, kemoterapi ve aşılama temel kontrol stratejileridir. Ancak, tek başına kenelerle mücadele veya kemoterapi hastalığa karşı etkin bir koruma sağlamamaktadır. Bu gün çok sayıda ülkede kullanılan ve etkin bir koruma sağladığı ifade edilen canlı attenuye aşıların da bazı dezavantajları vardır. Bunların başında, aşının hazırlanmasının zor ve zaman alıcı olması, her aşı serisinin kontrolünün pahalı olması, endemik stabil olmayan bölgelerde aşının tekrarının gerekmesi sayılabilir. Rekombinant subunit aşıların geliştirilmesiyle bu olumsuzlukların giderilmesi amaçlanmaktadır (2).

*Theileria annulata*'ya karşı rekombinant subunit aşı ve tanı amaçlı test geliştirme çalışmalarında kullanılan proteinlerden biri olan Tams1, parazitin en belirgin immunodominant antijendir. Bu antijen analizi yapılan bütün *T. annulata* suşlarında bulunmuştur (5, 6, 7). Ancak suşlar arasında, Tams1 geninde farklılıkların bulunduğu ve bu genetik polimorfizmin allelik varyasyon düzeyinde olduğu bildirilmiştir (4). Bu durum, aşı ve tanı amaçlı test geliştirme çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, *T. annulata*'ta Tams1 geninin genetik polimorfizminin belirlenmesi, aşı ya da tanı amaçlı test geliştirmeye alanlarında yapılacak ileri çalışmalara temel oluşturacaktır.

Bu çalışmada Elazığ ve Bingöl illerinde, doğal enfekte sığırlardan elde edilen *T. annulata* izolatlarının, Tams1 geninin PCR-RFLP analizi yapılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Nisan 2001 – Ekim 2004 tarihleri arasında Elazığ ve Bingöl illeri ile bu illere bağlı değişik odaklarda yürütülmüştür. Bu odaklardaki rasgele seçilen bir yaşımdan büyük sığırlardan, DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere, 3'er ml EDTA'lı kan alınmıştır. Kan alınan hayvanların, mikroskopik muayene amacıyla kuyruk ucundan perifer kan frotileri de hazırlanmıştır. Mikroskopik muayene ve DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere, Elazığ'dan 170, Bingöl'den 90 sığır olmak üzere toplam sığırdan kan ve frotiler alınmıştır. Kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde *Theileria* spp. ile

Geliş tarihi/Submission date: 24 Nisan/24 April 2007

Düzeltilme tarihi/Revision date: -

Kabul tarihi/Accepted date: 18 Mayıs/18 May 2007

Yazışma /Corresponding Author: Kürşat Altay

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

E mail: kaltay@firat.edu.tr

III. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi'nde (6-9 Kasım 2006, Diyarbakır) sunulmuştur.

enfekte olduğu belirlenen örnekler DNA ekstraksiyonunda kullanılmıştır.

**Kan Frotilerinin Mikroskopik Muayenesi:** Elazığ ve Bingöl illerinde, sığırlardan hazırlanan kuyruk ucu kan frotileri, laboratuvarında metil alkol ile beş dakika tespit edildikten sonra, %5'lik Giemsa solüsyonu ile 30 dk. boyanmıştır. Frotiler immersion objektifte (X 1000) *Theileria* piropasmları yönünden incelenmiştir. Mikroskopik bakıda, her frotide en az 200 mikroskop sahası incelenmiş ve tek etkenin görülmesi durumunda dahi froti pozitif kabul edilmiştir.

**DNA Ekstraksiyonu:** Mikroskopik muayenede *Theileria* spp. ile enfekte olduğu belirlenen kan örneklerinden Clausen ve ark. (3)'ün bildirdiği şekilde DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

**PCR-RFLP Analizi:** *Theileria* spp. ile enfekte kanlardan elde edilen total DNA'dan, PCR ile *T. annulata*'nın Tams1 geni amplifiye edilmiştir. Bu amaçla, Tams1 F (5' – ATGCTGCAAATGAGGAT – 3') ve Tspml R (5' – GGACTGATGAGAAGACGATGAG – 3') primerleri kullanılmıştır (13). PCR, Kirvar ve ark. (13)'ün bildirdiği şekilde yapılmıştır. PCR ürünlerinin 20 µl'si % 1.5'lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı izlenmiştir. Pozitif örneklerin 12,5 µl'si RFLP analizinde kullanılmıştır.

PCR ile amplifiye edilen *T. annulata* Tams1 geni TaqI enzimi ile restriksiyona tabi tutulmuştur. 12,5 µl PCR ürünü, 1 U TaqI ile 65° C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra % 2,5'lik agarose jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp UV transilluminatörde restriksiyon profilleri görüntülenmiştir (Şekil 1).

## BULGULAR

Elazığ ve Bingöl'de 260 sığırdan elde edilen perifer kan frotilerinin mikroskopik bakı (MB) sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Elazığ ve Bingöl yörelerinde perifer kan frotileri incelenen sığırların mikroskopik bakı sonuçları.

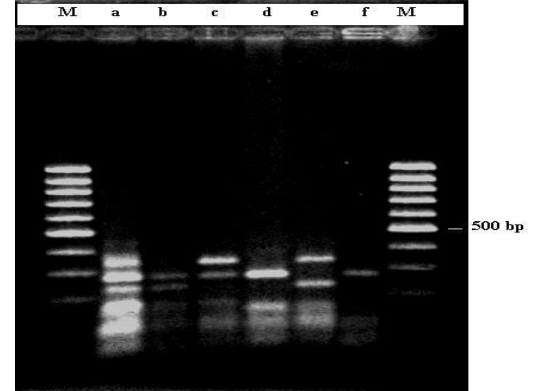
Odak	Hayvan Sayısı	+	%
Elazığ	170	40	23,53
Bingöl	90	52	57,78
<b>Toplam</b>	<b>260</b>	<b>92</b>	<b>35,38</b>

Tablo 1'de görüldüğü gibi perifer kan frotilerinin MB'da, Elazığ'da 170 sığırın 40'ında (%23,53), Bingöl'de 90 sığırın 52'sinde (%57,78) *Theileria* spp. piropasmlarına rastlanmıştır. Elazığ ve Bingöl'de incelenen toplam 260 sığırın 92'sinde (%35,38) *Theileria* spp. piropasmları tespit edilmiştir.

Perifer kan frotilerinin mikroskopik bakısında *Theileria* spp. piropasmları belirlenen 92 örneğin 89 (%96,74)'unda, PCR ile *T. annulata* Tams1 geni amplifiye edilmiştir. Geriye kalan 3 örnekte *T. annulata* amplifiye edilememiştir.

Elazığ ve Bingöl'de *T. annulata* ile enfekte olduğu belirlenen

89 sığırdan amplifiye edilen, Tams1 geninin PCR-RFLP analizinden elde edilen restriksiyon profilleri Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi Tams1 geninin TaqI ile restriksiyonu sonucunda altı (a, b, c, d, e, f) farklı restriksiyon profili elde edilmiştir.



**Şekil 1.** Elazığ ve Bingöl'de *T. annulata* ile doğal enfekte 89 sığırdan amplifiye edilen Tams1 geninin TaqI enzimi ile restriksiyonu sonucunda oluşan profillerin ethidium bromide ile boyalı agaroz jelde görüntüsü. M: 100 baz çiftlik marker, a,b,c,d,e,f: Tams1 restriksiyon profilleri.

*Theileria annulata* Tams1 geninin, TaqI enzimi ile restriksiyon analizinde elde edilen profillerin dağılımı Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü gibi toplam altı restriksiyon profilinin dağılımı; 78 (a), 2 (b), 2 (c), 5 (d), 1 (e) ve 1 (f)'dir. Elazığ ve Bingöl'de dörder profile rastlanmış olup, Elazığ'da Bingöl'den (c, d), Bingöl'de ise Elazığ'dan (e, f) farklı iki restriksiyon profili belirlenmiştir.

**Tablo 2.** Elazığ ve Bingöl'de *T. annulata* Tams1 geninin, TaqI enzimi ile restriksiyon analizinden elde edilen profillerin dağılımı.

Odak	a	b	c	d	e	f	Toplam
Elazığ	32	1	2	5	0	0	40
Bingöl	46	1	0	0	1	1	49
<b>Toplam</b>	<b>78</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>89</b>

## TARTIŞMA

Tams1, *T. annulata*'nın en belirgin immunodominant antijeni olup, bazı çalışmalarda Tams1'i kodlayan genlerin suşlar arasında farklılık gösterdiği (4), Tams1 geni DNA dizilimleri arasındaki farklılıkların, antijenik varyasyon oluşturacak düzeyde olduğu belirlenmiştir (12). *T. annulata* Tams1 genindeki polimorfizminin coğrafi dağılımla ilişkili olmadığı da ortaya konulmuştur. Bahreyn, Hindistan, İtalya, Moritanya, Portekiz, İspanya, Sudan, Tunus ve Türkiye'den alınan *T. annulata* izolatlarının Tams1 geni DNA dizilimlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, aynı coğrafi bölge izolatları arasında da *T. annulata* Tams1 geninin belirgin bir polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir (8). *T. annulata*, Tams1 genindeki görülen

polimorfizmin, gerek aşı ve gerekse tanı amaçlı test geliştirme çalışmalarını zorlaştırmaktadır (4, 10). Bu çalışmada, Elazığ ve Bingöl'de doğal enfekte sığırlardan elde edilen *T. annulata* izolatlarının Tams1 geninin PCR-RFLP analizi yapılmıştır. Sonuç olarak Elazığ ve Bingöl'de toplam altı farklı restriksiyon profili belirlenmiş olup, yapılacak aşı ya da tanı amaçlı test geliştirme çalışmalarında bu durumun dikkate alınması gerektiği ortaya çıkmıştır. Yine bu çalışmada, kan frotilerinin mikroskopik muayenesinde *Theileria* spp. piroplasm formları tespit edilen üç sığırdan PCR ile *T. annulata* amplifiye edilememiş, bu üç sığırın *T. annulata* dışında bir türle enfekte olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Doğu Anadolu bölgesinde sığır theileriosisi ile ilgili bir çalışmada (1), bölgede sığırlarda *T. annulata*'ya ilaveten *T. buffeli/orientalis*'in varlığının ortaya konmuş olması da yukarıdaki yorumu doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Elazığ ve Bingöl'de *T. annulata*, Tams1 geninin en az altı farklı genotipe sahip olduğu ortaya konmuş, elde edilen bulguların yapılacak ileri çalışmalara temel oluşturacağı kanaatine varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Aktas M, Altay K, Dumanlı 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.
2. Brown CGD, 1990. Control of theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia*, 32: 23-31.
3. Clausen PH, Wiemann A, Patzelt R, Kakair D, Pöttsch C, Peregrine A, Mehlitz D, 1999. 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.
4. Dickson J, Shiels BR, 1993. Antigenic diversity of a major merozoite surface-molecule in *Theileria-annulata*. *Mol Biochem Parasitol*, 57: 55- 64.
5. d'Oliveira C, Feenstra A, Vos H, Osterhaus A, Shiels BR, Cornlissen WCA, Jongejan F, 1997. Induction of protective immunity to *Theileria annulata* using two major merozoite surface antigens presented by different delivery systems. *Vaccine*, 15: 1796-1804.
6. Glascodine J, Tetley L, Tait A, Brown D, Shiels B, 1990. Developmental expression of a *Theileria annulata* merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol*, 40: 105-112.
7. Gubbels MJ, d'Oliveira C, Jongejan F, 2000. Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(3): 404-11.
8. Gubbels MJ, Katzer F, Geoff H, Jongejan F, Shiels BR, 2000. Generation of a mosaic pattern of diversity in the major merozoite-piroplasm surface antigen of *Theileria annulata*. *Mol Biochem Parasit*, 110: 23-32.
9. İnci A, Çakmak A, Çam Y, Karaer Z, Atasever A, İça A, 2002. Kayseri yöresinde tropikal theileriosis'e bağlı ekonomik kayıplar. *Türkiye Parazit Derg*, 26(2): 156-160.
10. Karagenc Tİ, Eren H, 2002. Tropikal theileriosisde aşılama. *Türkiye Parazit Derg*, 26(3): 266-270.
11. Karaer Z, 1986. Türkiye'de tropikal theileriosis. Hayvancılık Sempozyumu, Cumhuriyet Üni Tokat Ziraat Fakültesi, p: 412-421.
12. Katzer F, Mckellar S, Ben Miled L, d'Oliveira C, Shiels B, 1998. Selection for antigenic diversity of Tams1, the major merozoite antigen of *Theileria annulata*. *Ann NY Acad Sci*, 849: 96-108.
13. Kirvar E, Ilhan 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. Purnell RE, 1978. *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries on the Northern Mediterranean Littoral. *Vet Sci Commun*, 2: 3-11.
15. Uilenberg G, 1981. Theilerial Species of Domestic Livestock. Irvin AD, Cunningham MP, Young AS. Eds. *Advances in the Control of Theileriosis*. Martinus Nijhoff Publishers.