

Acanthamoeba'nın Hızlı Tespiti için 18S rRNA Genine Özgü Hızlı Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) Testinin Geliştirilmesi ve Hassasiyetinin Belirlenmesi

Development and Sensitivity Determination of 18S rRNA Gene-specific Fast Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of Acanthamoeba

İD Mehmet Aykur¹, İD Muhammet Karakavuk^{2,3}, İD Mesut Akıl⁴, İD Hüseyin Can^{3,5}, İD Mert Döşkaya^{3,6}, İD Adnan Yüksel Gürüz^{3,6}, İD Hande Dağcı⁶, İD Aysu Değirmenci Döşkaya^{3,6}

¹Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye

²Ege Üniversitesi Ödemiş Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Aşı Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi, İzmir, Türkiye

⁴İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye

⁶Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Cite this article as: Aykur M, Karakavuk M, Akıl M, Can H, Döşkaya M, Gürüz AY, Dağcı H, Değirmenci Döşkaya A. Development and Sensitivity Determination of 18S rRNA Gene-specific Fast Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of Acanthamoeba. Türkiye Parazitol Derg 2023;47(3):129-35.

ÖZ

Amaç: Serbest yaşayan amiplerden biri olan *Acanthamoeba*, başta su, toprak ve hava olmak üzere birçok çevresel örnekte tespit edilmiştir. *Acanthamoeba*'nın neden olduğu en önemli klinik tablolar içinde *Acanthamoeba* keratiti ve granülatöz amibik ensefalit bulunmaktadır. Bu çalışmada klinik ve çevresel örneklerde *Acanthamoeba*'nın varlığının daha hızlı bir şekilde saptanabilmesi için *Acanthamoeba* 18S rRNA gen bölgesine özgü primerler ile geliştirilen hızlı döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) testinin hassasiyetinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Kültürde çoğaltılan *Acanthamoeba* spp. suşu 200 µL'de 1x10⁶ trofozoit olacak şekilde sulandırılıp DNA izolasyonu yapılarak DNA miktarı Nano-Drop Spektrofotometre ile belirlenmiştir. Saflaştırılan DNA'lar 1000 pg'den 0,001 pg'ye kadar seyreltilip, kolorimetrik ve floresan tabanlı iki farklı LAMP reaksiyonunda kullanılmıştır. LAMP reaksiyon karışımı toplam 25 µL hacimde 63 °C'de 60 dk olacak şekilde inkübe edilmiştir.

Bulgular: Geliştirilen testlerin hassasiyetinin saptanmasında elde edilen *Acanthamoeba* spp. genomik DNA'sını hem kolorimetrik hem de floresan tabanlı LAMP testlerinde 1, 10, 100 ve 1000 pg/reaksiyon pozitiflik gözlenmiştir. Hem kolorimetrik hem de floresan LAMP testinin en düşük analitik hassasiyeti 1 pg/reaksiyon olarak tespit edildi. Ayrıca, testin özgüllüğünü değerlendirmek için diğer parazit DNA'ları ile uygulanan LAMP reaksiyonu sonucunda kolorimetrik ve %1'lik agaroz jel elektroforezinde pozitif kontrol dışında LAMP ürünü tespit edilmemiş olup, geliştirilen testin özgüllüğü %100 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA gen bölgesi hedef alınarak geliştirilen LAMP testinin 1 pg genomik DNA saptama limitine sahip olduğu ortaya konulmuştur. LAMP testinin kültür yöntemine göre daha hassas ve hızlı olmasının yanı sıra basit, ucuz ve yüksek hassasiyete sahip olması umut vericidir. Bu nedenle geliştirilen testin çevresel ve klinik örneklerde *Acanthamoeba* spp. tanısı için uygulanabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Acanthamoeba* spp., 18S rRNA geni, hassasiyet, kolorimetrik LAMP, floresan LAMP

Geliş Tarihi/Received: 24.10.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 29.03.2023

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Mehmet Aykur, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye

Tel/Phone: +90 534 575 11 46 **E-Posta/E-mail:** mehmetaykur@gmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-6100-1037

©Telif hakkı 2023 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.turkiyeparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC-ND) 4.0 International License.

ABSTRACT

Objective: *Acanthamoeba*, one of the free-living amoeba, has been detected in many environmental samples, mainly in water, soil and air. *Acanthamoeba* keratitis and granulomatous amoebic encephalitis are among the most important clinical manifestations caused by *Acanthamoeba*. In this study, it was aimed to determine the sensitivity of the rapid loop mediated isothermal amplification (LAMP) test designed with primers specific to *Acanthamoeba* 18S rRNA gene to detect more rapidly the presence of *Acanthamoeba* in clinical and environmental samples.

Methods: *Acanthamoeba* strain grown in culture was diluted in 200 µL as 1×10^6 trophozoites and DNA was isolated, and the amount of DNA was determined by Nano-Drop Spectrophotometer. The purified DNAs were diluted from 1000 pg to 0.001 pg and used in colorimetric and fluorescence-based LAMP reactions. The LAMP reaction mixture was incubated for 60 minutes at 63 °C in a total volume of 25 µL.

Results: To determine the sensitivity of the test, positivity of *Acanthamoeba* genomic DNA was observed at 1, 10, 100 and 1000 pg/reaction in both colorimetric and fluorescence-based LAMP tests. The lowest analytical sensitivity of both colorimetric and fluorescent LAMP assay was determined as 1 pg/reaction. In addition, as a result of LAMP reaction applied with other parasite DNAs to evaluate the specificity of the test, no LAMP product was detected in colorimetric and 1% agarose gel electrophoresis, except for positive control, and the specificity of the test was determined as 100%.

Conclusion: It has been demonstrated that the LAMP assay designed by targeting 18S rRNA gene of *Acanthamoeba* has a detection limit of 1 pg of genomic DNA. It is promising that LAMP test is more sensitive and faster than culture method, as well as simple, inexpensive and highly sensitive. For this reason, it is thought that developed test can be applied in the diagnosis of *Acanthamoeba* in environmental and clinical samples.

Keywords: *Acanthamoeba* spp., 18S rRNA gene, sensitivity, colorimetric LAMP, fluorescence LAMP

GİRİŞ

Serbest yaşayan amiplerden biri olan *Acanthamoeba* cinsindeki türler, toprak, tatlı su kaynakları ve denizler gibi doğal ekosistemlerin yanı sıra havalandırma sistemleri, havuzlar, ameliyathaneler gibi insan yapımı alanlarda da yaşayabilmektedir (1-3). Ayrıca, kontakt lenslerden, lens saklama kapları ve solüsyonlarından da *Acanthamoeba* izole edilmiştir. Bu fırsatçı amip, merkezi sinir sistemi hastalığı olan granülatöz amibik ensefalit (GAE), gözde görmeyi tehdit eden bir göz hastalığı olan *Acanthamoeba* keratitine (AK) ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde *Acanthamoeba* pnömonisi ve deri lezyonları gibi çeşitli klinik semptomlara yol açabilmektedir (4). Ayrıca, bu hastalıklar yalnızca insanlarda değil aynı zamanda da hayvanlarda görülmektedir (5). Köpek, sığır, kuş ve at gibi bazı hayvanlarda da bu fırsatçı patojenin enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmiştir (6-8).

Acanthamoeba'nın yaşam döngüsünde trofozoit ve kist olmak üzere iki formu vardır. Trofozoit formu aktif olarak beslenen, büyüyen, çoğalan ve hareket eden bir formudur. Kist formu ise olumsuz dış çevre koşullarına karşı daha dayanıklı olan formudur (1). Trofozoitler, sıcaklık ve pH uygun ve gıda yeterli ise yaşayabilirler. Ancak bu faktörlerin yokluğunda endokist ve ektokistten oluşan çift duvarlı bir kiste dönüşür. Zorlu koşullara dayanıklı olan kistler antibiyotiklere, klora ve dezenfektanlara karşı dirençlidirler. Koşullar tekrar uygun olduğunda, eksitasyon ile trofozoit formuna dönüşebilirler (1,9).

Acanthamoeba, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda nadir görülen ancak ölümcül GAE'ye neden olur. GAE'nin ölüm oranı %97-98 civarındadır. Bugüne kadar, tüm dünyada yaklaşık 200'den fazla *Acanthamoeba*'nın neden olduğu GAE olgusu rapor edilmiştir (10). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl *Acanthamoeba*'nın neden olduğu yaklaşık 10 GAE olgusu bildirilmektedir (11). Türkiye'de bugüne kadar *Acanthamoeba*'nın sebep olduğu toplam dört GAE olgusu rapor edilmiştir (12). Özellikle gelişmiş ülkelerde AK olgularının küresel insidans oranı artmaya devam etmekte olup ve en önemli risk faktörü olarak kontakt lens kullanıcıları olguların %85-88'ini oluşturduğu bildirilmiştir (13). Son zamanlarda, miyopi ve kozmetik amaçlı kontakt lens kullananların sayısı artmış ve kornea lazer refraktif cerrahi sonrası AK, nadir de olsa bildirilmiştir (14). Kontakt lens

kullanımının daha az olduğu gelişmekte olan ülkelerde çoğu olgunun travma ile ilişkili olmasının yanı sıra, ana bulaş kaynağı kontamine su, toprak ve toz olduğu belirtilmiştir (13,15,16).

AK'nin erken teşhisi etkili tedavi için önemlidir. Ancak, AK sıklıkla başlangıçta herpes simpleks virüsü, bakteriyel veya fungal keratite benzerlik gösterdiğinden yanlış teşhis edilebilir. Bu yüzden tedavide gecikmeler olur ve sıklıkla önemli görme kaybına veya kornea nakli ameliyatına sebep olabilir (16). *Acanthamoeba*'nın klinik örneklerde tanısında mikroskopik inceleme, kültür yöntemi gibi yöntemlerle doğrudan patojenin varlığının tanımlanması hem zaman alıcı hem de teknik uzmanlık gerektiren bir yöntemdir. Ayrıca, bu yöntemler genellikle hassas, uygun veya kesin bir teşhis için yeterince uygulanabilir değildir (13,17). *Acanthamoeba*'nın saptanmasını daha da iyileştirmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), gerçek zamanlı PZR gibi moleküler yöntemler kullanılması daha yüksek hassasiyette ve daha kısa süre gerektirmesine rağmen pahalı laboratuvar ekipmanlarına duyulan ihtiyaç nedeniyle hala yaygın olarak kullanılmamaktadır (17-19). Bu nedenle *Acanthamoeba* tanısı için basit, hızlı ve hassas bir tanısal teste ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemi teşhis amacıyla kullanılan ilk izotermal moleküler tabanlı bir yöntemdir. Bu yöntem, geleneksel DNA tabanlı teşhis yöntemlerine umut verici bir alternatiftir. Çünkü hızlı DNA amplifikasyonuna dayalı, basit ve oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir testtir. LAMP yönteminde izotermal koşullar altında *Bacillus stearothermophilus* DNA polimerazı ve spesifik olarak tasarlanmış 4-6 primer kullanarak bir saatten daha kısa sürede hedef DNA'nın 10^9 kopya sayısına kadar çoğaltılabilmektedir (20). LAMP tekniğinde kullanılan primer sayısının PZR'de kullanılanlardan daha fazla olması amplifikasyonun özgüllüğünü ve hızını iyileştirir, böylece çoklu bantlardan oluşan tipik bir merdiven modeli üreten döngü yapılı bir amplikon oluşturur (21). Pozitif bir reaksiyon, bulanıklık olarak gözle kolorimetrik veya floresan boyaların eklenmesiyle kolayca belirlenir (22).

Bu çalışmada *Acanthamoeba* tanısını daha hızlı bir şekilde gerçekleştirmek için *Acanthamoeba* 18S rRNA gen bölgesine özgü primerler tasarlanarak hem kolorimetrik hem de floresan tabanlı hızlı LAMP testinin hassasiyetinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Acanthamoeba Kültürü ve Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan *Acanthamoeba* suşu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde AK'li bir hastanın gözünden izole edilmiş ve bu izolat genotipi önceki çalışmamızda T4 (GenBank no: ON600789.1) olarak tanımlanmıştır (23). Kriyopreservasyon (-80 °C) işlemi ile saklanmış olan *Acanthamoeba* suşunu tekrar canlandırmak için daha önce hazırlanmış olan %1,5'lik non-nutrient agarın (NNA) inaktive edilmiş *Escherichia coli* (ATCC 25992) ile yüzeyi kaplanan agar plakların üzerine eklenerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. NNA plaklarında çoğalma meydana geldikten sonra *Acanthamoeba* suşu aksenik kültür olan proteaz pepton %0,75, maya ekstresi %0,75 ve %1,5 glikoz içeren (PYG) ortamda 30 °C'de kültüre edilmiştir. Amipler toplanıp 500 g'de 10 dk santrifüj edilip ve PBS ile üç kez yıkanmıştır.

DNA İzolasyonu

Kültüre edilmiş *Acanthamoeba*'nın total genomik DNA'sı QIAamp DNA Mini Kit'i (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre izole edilmiştir. Kısaca; 200 µL'sinde 1×10^6 trofozoit içeren kültür sıvısı üzerine 20 µL proteinase K ve 200 µL buffer AL eklenip ardından 56 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 200 µL etanol eklenip vorteks yapıp ve QIAamp filtreli kolon tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra QIAamp filtreli kolon tüpleri iki kez sırasıyla 500 µL Buffer AW1 ve Buffer AW2 ile yıkanmıştır. DNA'yı elde etmek için 100 µL Buffer AE eklenerek santrifüj yapılmıştır. Ekstrakte edilen DNA miktarı Nano-Drop spektrofotometre ile ölçüldükten sonra çalışılncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

LAMP Primer Tasarımı

Acanthamoeba'ya özgü 18S rRNA geni hedefleyen altı farklı bölgeyi tanıyan iki iç ve iki dış primer setleri PrimerExplorer V5 yazılımı (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 1). Tasarlanan primerlerin *Acanthamoeba*'ya spesifik olduğu, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) BLAST programı kullanılarak (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kontrol edilmiştir.

LAMP Reaksiyonunun Optimizasyonu

LAMP testinin optimizasyonu için ilk olarak Kolorimetrik LAMP reaksiyonları, WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (New England Biolabs, Ipswich, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 25 µL LAMP reaksiyon içeriği; 12,5 µL WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master mix, 2,5 µL LAMP primer karışımı (final konsantrasyon FIP ve BIP: 1,6 µM, F3 ve B3: 0,2 µM, LF ve LB 0,4 µM), 1 µL total genomik DNA ve 9 µL nükleaz içermeyen su ile hazırlanmıştır. İkinci olarak, WarmStart

Fluorescent LAMP (DNA&RNA) kiti (New England Biolabs, Ipswich, ABD) kullanılarak toplam hacmi 25 µL olan reaksiyon; 12,5 µL, WarmStart LAMP 2X Master mix, 2,5 µL LAMP primer karışımı (final konsantrasyon FIP ve BIP: 1,6 µM, F3 ve B3: 0,2 µM, LF ve LB 0,4 µM), 0,5 µL floresan boya, 1 µL total genomik DNA ve 8,5 µL nükleaz içermeyen su ile hazırlanmıştır. LAMP reaksiyonları termal blokta 59, 61, 63 ve 65 °C sıcaklıklarda optimal sıcaklığın ve sürenin belirlenmesi için 30, 45 ve 60 dakika olacak şekilde test edilmiştir. Elde edilen LAMP ürünleri %1 agaroz jel elektroforezi üzerinde yürütülüp ve SafeView Classic (Abm, Kanada) eklenerek DNR Bio-görüntüleme sistemleri altında görüntülenmiştir.

Acanthamoeba'nın Analitik Hassasiyeti

Kolorimetrik ve floresan LAMP testlerinin tanımlayabileceği minimum DNA miktarını belirlemek ve LAMP reaksiyonunun duyarlılığının değerlendirmesi için, *Acanthamoeba* DNA'sının 10 kat seri sulandırılmaları (1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 pg/µL) kullanılmıştır. Kolorimetrik ve floresan LAMP reaksiyonları yukarıda tespit edilen (63 °C'de 60 dakika) optimal koşullara göre yapılmıştır. Kolorimetrik LAMP testinin sonuçlarının değerlendirilmesinde indikatörlerin pH değişikliğine bağlı olarak pembe renkten sarı renge dönüşmektedir. Böylece pembe renk negatif durumu gösterirken sarı renk pozitif durumu ifade edecek şekilde yorumlanmıştır. Floresan LAMP testinin değerlendirilmesinde ise ultraviyole (UV) ışığı altında floresan yansımalar incelenmiştir.

Ayrıca kolorimetrik LAMP testinin özgüllüğünü saptamak için diğer parazit etkenlerinden (*Giardia intestinalis*, *Leishmania infantum*, *Blastocystis*, *Toxoplasma gondii* ve *Naegleria fowleri*) elde edilen genomik DNA'lar LAMP ile amplifiye edilip %1 agaroz jel elektroforezi üzerinde yürütülmüştür.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analiz yapılmamıştır.

BULGULAR

Acanthamoeba Kültürü ve DNA İzolasyonu

Acanthamoeba suşu NNA plaklarında çoğalması görüldükten sonra aksenik kültür olan PYG besiyerine alınarak çoğalması için 30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 7 gün sonra *Acanthamoeba*'nın %95'i trofozoit formunda ve %5'i ise kist formunda tespit edilmiştir (Şekil 1). Amipler toplanıp hemositometre kullanılarak mikroskop altında sayılmıştır. Amipler DNA izolasyonu için 200 µL'de 1×10^6 olacak şekilde hesaplanmıştır. DNA izolasyonu yapıldıktan sonra Nano-Drop spektrofotometre ile ölçülerek total genomik *Acanthamoeba* DNA konsantrasyonu 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 pg olacak şekilde sulandırılmıştır.

Tablo 1. *Acanthamoeba* spp. 18S rRNA genine özgü LAMP testi için tasarlanan primerler

Primerler	Hedef gen	Sekans (5' → 3')
F3	18S rRNA	GGGGATCGAAGACGATCAGA
B3		CCCCGGAACCCAAAGACT
FIB		GCGCCGATGGTGGTGTTTGTAAACCATAACGATGCCGACC
BIP		GGCGTCTGTCCCTTTCAACGGCTGCTAGGGGAGTCATTAC
LF		TTCAACGTCTCCTAATCGCT
LB		GGTTTAGCCCGGTGGCA

LAMP Primer Tasarımı

LAMP yöntemi ile *Acanthamoeba*'yı saptamak için PrimerExplorer V5 programı kullanılarak tasarlanan *Acanthamoeba castellanii* Neff suşun (GenBank No: U07416) 18S rRNA bölgesine özgü 6 LAMP primerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Tasarlanan primerlerin *Acanthamoeba* ile %100 benzerlik gösterdiği ve diğer parazitler ile benzerliği bulunmadığı online NCBI BLAST programı ile değerlendirilmiştir.

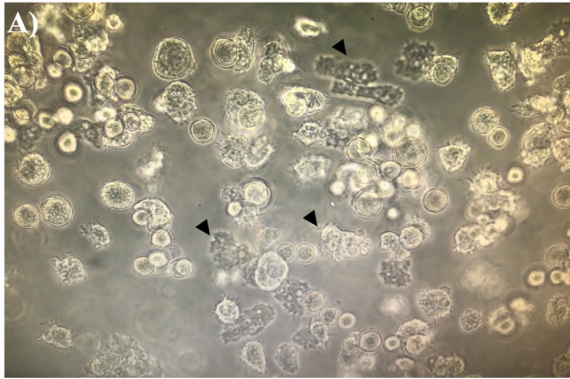
LAMP Reaksiyonun Optimizasyonu

LAMP'ın optimizasyonu için 30, 45 ve 60 dakika olacak şekilde 59, 61, 63 ve 65 °C sıcaklıklarda inkübe edilerek elde edilen LAMP ürünleri değerlendirilmiştir. Her ne kadar 45 dakikalık inkübasyonda LAMP ürünü gözlenmiş olsa da elde edilen ürünün rengi, pembe renk olan negatif kontrol ile karıştırılabilecek olan turuncuya dönüştüğü gözlenmiştir. Bu yüzden elde edilen sonuçlar hem kolorimetrik hem de floresan LAMP testinin 60 dakika süreyle 63 °C'de inkübasyonda en iyi ürün tespit edilmiştir.

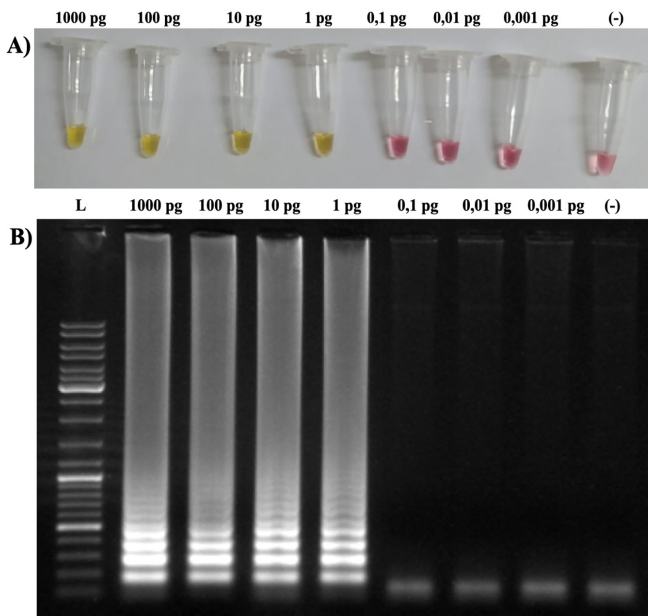
Kolorimetrik LAMP reaksiyonunda pozitif örneklerde pembeden sarıya bir renk değişimi görülürken, negatif örneklerde pembe olarak kalmıştır. Floresan LAMP reaksiyonunda pozitif örnekler UV ışık altında ışıma vererek tespit edilmiştir.

Acanthamoeba'nın Analitik Hassasiyeti

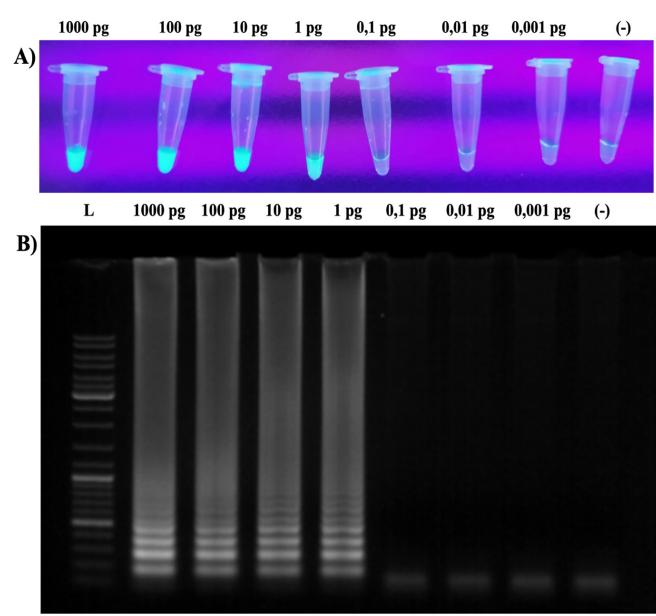
Nano-Drop Spektrofotometre ile ölçülen total genomik *Acanthamoeba* DNA konsantrasyonu 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 pg olacak şekilde farklı oranlarda sulandırılmıştır. Bir dizi sulandırılan örnekler ile yapılan LAMP reaksiyonu sonucunda kolorimetrik gözlemlerde 1, 10, 100 ve 1000 pg/reaksiyon tüplerinde rengin pembeden sarıya dönüştüğü gözlenmiştir (Şekil 2A) ve aynı şekilde floresan LAMP reaksiyon sonucunda da UV ışını altında 1, 10, 100 ve 1000 pg/reaksiyon tüplerinde ışıma gözlenmiştir (Şekil 3A). Ayrıca, LAMP ile pozitif olarak tespit edilen testin en düşük konsantrasyon %1'lik agaroz jel elektroforez üzerinde yürütüp oluşan bantlar ile test doğrulanmıştır (Şekil 2B, 3B). Böylece hem kolorimetrik hem de floresan LAMP testinin en düşük analitik hassasiyeti 1 pg/reaksiyon olarak tespit edilmiştir.



Şekil 1. A) PYG besiyerinde çoğalmış *Acanthamoeba* trofozoitleri (siyah ok başı), **B)** Giemsa boyama yöntemi ile boyanmış *Acanthamoeba* kist şekilleri



Şekil 2. LAMP reaksiyonunda *Acanthamoeba* DNA'sının bir seri seyreltilmesinin **A)** Kolorimetrik görüntüleme ile analitik hassasiyetinin gösterilmesi **B)** %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (-) Negatif kontrol



Şekil 3. LAMP reaksiyonunda *Acanthamoeba* DNA'sının bir seri seyreltilmesinin **A)** Ultraviyole altında floresan boya ile analitik hassasiyetinin gösterilmesi **B)** %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (-) Negatif kontrol

Çalışmamızda LAMP testinin özgüllüğünü değerlendirmek için *Giardia intestinalis*, *Leishmania infantum*, *Blastocystis* sp., *Toxoplasma gondii* ve *Naegleria fowleri*'nin DNA örnekleri kullanılmıştır. Kolorimetrik LAMP testinde pozitif kontrolde sarı renk görülür iken diğer örneklerde herhangi bir renk değişikliği olmayıp pembe renk olarak gözlenmiştir (Şekil 4A). Ayrıca, LAMP ürünü %1'lik agaroz jel elektroforezinde yalnızca pozitif kontrolde (*Acanthamoeba* T4 genotipi, GenBank no: ON600789.1) amplifiye ürünler görülürken diğer parazit DNA'larının ürünlerinde herhangi bir bant görülmemiştir (Şekil 4B).

TARTIŞMA

Acanthamoeba cinsinin birçok türleri ve bazı genotipleri dünyanın birçok yerinde yaygın olarak görülmektedir. Bu amipler suda, toprakta, havada, sebze ve meyvelerde, kontakt lens solüsyonlarında, hayvanlarda, insan dokuları ve boşluklarında tespit edilmiştir (1,4,24,25). *Acanthamoeba* insanlarda merkezi sinir sistemini etkileyen ciddi enfeksiyon olan GAE ve görmeyi tehdit eden AK'ye sebep olmaktadır. Ayrıca, kontakt lens takanlar için büyük bir risk olan AK'nin insidansının son yıllarda arttığı bildirilmiştir (4,16). Bu parazitin sebep olduğu hastalıkların teşhis edilmesi ve yönetilmesi oldukça zordur. Ayrıca, etkili bir tedavi sağlanabilmesi için hızlı, duyarlı, ucuz ve kolayca uygulanabilen ve yorumlanabilen sonuçlar sağlayan bir tanı yöntemi gerektirir. Özellikle AK tanısında erken tanı hayati önem taşımaktadır. Ancak, hastalığın erken klinik görünümü Herpes ve mantar enfeksiyonları ile kolay bir şekilde karışabilmektedir. Bu yüzden yanlış tanıya sebep olarak tedavinin gecikmesine sebep olmaktadır (26,27). Kornea kazıntı örneklerinin doğrudan yaymaları veya

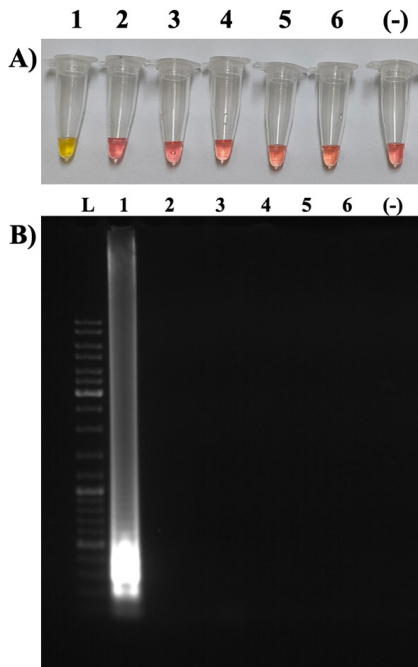
kültüre edilmiş örneklerinin mikroskopik tanımlanmaları, AK'nin laboratuvar teşhisinde oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Ancak, *Acanthamoeba* trofozoitleri ve kistlerinin genellikle kazınmış hücrelere veya hücre döküntülerine benzer olduğundan dolayı ayırt etmek zaman alıcı ve teknik uzmanlık gerektirmektedir. Konfokal mikroskopu, yakın zamanda, kültür ve mikrobiyolojik analizlere ihtiyaç kalmadan *in vivo* olarak enfeksiyonun hızlı teşhisini sağlamaktadır. Ancak bu yöntem her laboratuvar için uygun olmayan pahalı ve özel uzmanlık gerektiren bir araçtır (28,29). Bu nedenle, *Acanthamoeba*'nın laboratuvar tanısının için hassas, hızlı ve düşük maliyetli bir yöntem gereklidir. Bu çalışmada *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA gen bölgesine özgü primerler tasarlanarak hem kolorimetrik hem de floresan görüntüleme yöntemleri kullanılarak hassas, ucuz ve hızlı LAMP testinin etkinliği gösterilmiştir.

Acanthamoeba'nın doku, kornea kazıntıları veya çevresel örneklerde tanımlamak için PZR ve genomik dizileme gibi yöntemler geliştirilmiştir. Ancak, *Acanthamoeba*'nın teşhisi için kullanılan bu yöntemin reaksiyon süresinin uzun olması, maliyetinin yüksek ve karmaşık olması, pahalı laboratuvar cihazları gerektirmesi ve alanında uzman bir kişiye ihtiyaç duyulması açısından dezavantajları bulunmaktadır (19,30). Ancak, PZR'den daha ucuz ve daha verimli olan LAMP yöntemi, 2000 yılında Notomi ve ark. (20) tarafından geliştirilen nispeten yeni bir moleküler tekniktir. LAMP testi için dört primer hedefin altı farklı bölgesi için tasarlanan primerler sayesinde, hedef diziyi yüksek seçicilik ve özgüllükle çoğaltması beklenir. Hemen hemen tüm araştırmalarda LAMP tekniğinin özgüllüğünün %100'e yakın olduğu bildirilmiştir (21). Bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyonların moleküler tespiti dahil birçok klinik uygulama için LAMP tekniği başarılı bir şekilde rapor edilmiştir (31,32). LAMP, pahalı olmayan su banyosu gibi ucuz cihazlar ile gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, PZR'de kullanılan agaroz jel elektroforezi gibi uygulamalara ihtiyaç duyulmamaktadır. Test sonucu oluşan renk değişikliği çıplak gözle veya floresan boya kullanarak değerlendirilebilmektedir (21,33).

Bu çalışmada *Acanthamoeba*'nın 18S rRNA genine özgü LAMP primerleri tasarlanmıştır. *Acanthamoeba* genomunda bu gen bölgesi cinsine özgü olmasının yanı sıra genotipleme için de yaygın olarak kullanılan değişken bölgedir (19). Ayrıca, daha önceki çalışmalarda klinik ve çevresel örneklerin bu gen bölgesine ait primerlerin kullanılmasından dolayı bu çalışmada da bu bölge seçilmiştir (12,34-37).

Türkiye'de çeşitli çevresel ve klinik örneklerde bazı parazitlerin varlığı LAMP testi ile tespiti gerçekleştirilmiştir (38). Çevresel su örneklerinde *Cryptosporidium* oökitlerinin varlığının tespit edilmesinde LAMP yönteminin PZR yönteminden daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur (36). Ayrıca, çevresel su örneklerinde *Toxoplasma gondii*'nin B1 geni ile geliştirilen LAMP yöntemi ile 18S rRNA genine özgü PZR yöntemin karşılaştırılıp LAMP yönteminin daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (37). Başka bir çalışmada *Toxoplasma gondii*'nin RE gen bölgesine özgü LAMP primerleri tasarlanarak testin hassasiyeti 0,05 takizoit olarak tespit edilip PZR'ye göre RE gen bölgesi 1,000 kat daha hassas olduğu bildirilmiştir (32).

Acanthamoeba'nın tanısında altın standart olarak kültür yönteminin kabul edilmesine rağmen önceki çalışmalar LAMP testinin, direkt mikroskopik inceleme, kültür yöntemi ve PZR yöntemlerinden duyarlılığının ve özgüllüğünün daha yüksek olduğunu göstermiştir (39,40). Önceki çalışmalarda LAMP



Şekil 4. LAMP testinin özgüllüğünün gösterilmesi **A)** Kolorimetrik olarak elde edilen ürünlerin görüntüsü **B)** %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü, **1:** *Acanthamoeba* spp., **2:** *Giardia intestinalis*, **3:** *Leishmania infantum*, **4:** *Blastocystis*, **5:** *Toxoplasma gondii*, **6:** *Naegleria fowleri*
L: DNA ladder, (-): Negatif kontrol

yönteminin duyarlılığı *Acanthamoeba* spp.'nin DNA'sı bir seri sulandırma ile değerlendirilip, 10 pg *Acanthamoeba* DNA'sı floresan boya ile UV ışık altında gösterilmiştir (41). Bir başka çalışmada ise *in vitro* olarak kültüre edilmiş *Acanthamoeba* türlerinden ekstrakte edilen DNA'ların seyreltilerek LAMP testinde minimum genomik DNA konsantrasyonu 1 pg *Acanthamoeba* DNA'sı floresan boya ile tespit edilmiştir (39). Çalışmamızda kültüre ettiğimiz *Acanthamoeba*'dan elde edilen DNA'ların bir seri seyreltildikten sonra minimum genomik DNA konsantrasyonu 1 pg olarak hem kolorimetrik hem de floresan boya ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların daha hızlı ve hassas bir şekilde yorumlanabilmesi ve hasta başında uygulanabilir olması açısından kolorimetrik yöntem daha avantajlı olmaktadır. Ayrıca önceki çalışmalarda LAMP yönteminin PZR yönteminden 10 kat daha fazla duyarlı olduğu bildirilmiştir (41). LAMP yönteminin *Acanthamoeba*'yı tespit etmede örnekler ısıtılarak işlem uygulanarak elde edilen DNA ile pozitif tespit edilirken PZR yönteminde sadece kit ile ekstrakte edilmiş DNA kullanıldığında etkili olduğu rapor edilmiştir (39). LAMP ve PZR sonuçları arasındaki bu fark LAMP yönteminde toplam altı primer kullanılarak çalışmasından dolayı daha yüksek hassasiyete sahiptir (42). Bundan dolayı DNA izolasyon basamağına ihtiyaç duymadan özgün primerler kullanılarak tasarlanan LAMP yöntemi ile *Acanthamoeba*'nın tanısı için gereken süre kısaltılabilir.

Acanthamoeba'nın 18S rRNA genine özgü tasarlanan primerler daha önceki çalışmalarda AK ile benzer klinik gösteren göz enfeksiyonlarına neden olabilecek mantar (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, ve *Candida albicans*), bakteri (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*) ve viral (Herpes simpleks virüs tip 1) patojenler ile herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmediği rapor edilmektedir (39,40). Çalışmamızda LAMP testi için tasarlanan 18S rRNA genine özgü primerlerin çeşitli protozoanlar (*Giardia intestinalis*, *Leishmania infantum*, *Blastocystis* sp., *Toxoplasma gondii* ve *Naegleria fowleri*) ile herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir.

AK tanısında kullanılan kültür ve mikroskopik yöntemlerin her bir testi için yaklaşık 2,5 \$ olması açısından en ucuz yöntem olarak önemli bir avantaja sahipken, testlerin uzun zaman alması ve uzman personel gerektirmesi dezavantajlarıdır. Moleküler yöntemlerin gelişmesiyle daha hızlı ve hassas olan PZR yöntemleri her bir test için yaklaşık maliyeti 16,4-30 \$ olabilmekle birlikte gerekli olan zaman ise 120-150 dk arasında değişmekte ve pahalı laboratuvar cihazlarına gereksinim duyulmaktadır (43,44). Son yıllarda geliştirilen LAMP yöntemi ise daha duyarlı, hızlı ve ucuz olması açısından önemli bir moleküler testtir. Ayrıca tek bir su banyosu ile uygulanabilen ucuz bir yöntem olması, her bir test için yaklaşık 0,71-2 \$ maliyetinin olması, sonuçların 60-90 dk arasında değerlendirmesi gibi avantajlara sahiptir (21). Çalışmamızda uyguladığımız LAMP testi ile 60 dk içinde sonuca varılmıştır. Bu şekilde hastalığın tanısında sonuçlara hızlı bir şekilde ulaşılması sağlanarak, erken tedaviye başlanmasına olanak sağlayacaktır.

SONUÇ

Çalışmamızda, tasarladığımız primerler kullanılarak yapılan LAMP testi *Acanthamoeba*'nın DNA'sının varlığını saptamada kullanılabilecek basit, ucuz ve yüksek hassasiyete sahip umut verici bir tekniktir. LAMP testi, tek bir ekipman ile minimum donanımlı laboratuvarlarda, saha ortamlarında ve hasta başında kullanım için basit, hızlı, uygun maliyetli bir yöntemdir. Bu nedenle LAMP

testi, AK tanısının hızlı bir şekilde teşhisine yardımcı olmak için laboratuvar test yöntemi olarak klinik uygulama için dikkate değerdir. Ayrıca, çevresel örneklerde *Acanthamoeba* tarama çalışmalarında daha hızlı bir şekilde uygulanabilir bir testtir.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışmada insan veya hayvanlar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle yerel etik kurul onayına gerek duyulmamıştır.

Hasta Onayı: Bu çalışma için geçerli değildir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Konsept: M.A., M.K., M.D., Dizayn: M.A., M.K., H.C., A.D.D., Veri Toplama veya İşleme: M.A., H.C., M.K., Analiz veya Yorumlama: M.D., H.D., A.Y.G., H.C., M.A., Literatür Arama: M.A., M.K., Me.A., H.C., A.D.D., Yazan: M.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Khan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30: 564-95.
2. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. Naegleria and Acanthamoeba infections: review. Rev Infect Dis 1990; 12: 490-513.
3. Özçelik S, Coşkun KA, Yünlü O, Alim A, Malatyalı E. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. Türkiye Parazitoloj Derg 2012; 36: 198-203.
4. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50: 1-26.
5. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 2004; 34: 1001-27.
6. Valladares M, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Dorta-Gorriñ A, Wagner C, et al. Molecular characterization of Acanthamoeba strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. Arch Microbiol 2015; 197: 639-43.
7. Karakuş M, Aykur M, Özbel Y, Töz S, Dağcı H. Molecular detection and genotyping of Acanthamoeba spp. among stray dogs using conjunctival swab sampling. Acta Trop 2016; 164: 23-6.
8. Karakavuk M, Aykur M, Şahar EA, Karakuş M, Aldemir D, Döndüren Ö, et al. First time identification of Acanthamoeba genotypes in the cornea samples of wild birds; Is Acanthamoeba keratitis making the predatory birds a target? Exp Parasitol 2017; 183: 137-42.
9. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 273-307.
10. Cope JR, Ali IKM, Georgacopoulos O. Free-Living Ameba. Neurological Complications of Infectious Diseases: Springer; 2021.p.255-70.
11. Cope JR, Ali IK, Visvesvara GS. Pathogenic and Opportunistic Free-Living Ameba Infections. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases: Elsevier; 2020.p.814-20.
12. Aykur M, Dirim Erdogan D, Selvi Gunel N, Guler A, Biray Avcı C, Celebisoy N, et al. Genotyping and Molecular Identification of Acanthamoeba Genotype T4 and Naegleria fowleri from Cerebrospinal Fluid Samples of

- Patients in Turkey: Is it the Pathogens of Unknown Causes of Death? Acta Parasitol 2022; 67: 1372-83.
13. de Lacerda AG, Lira M. Acanthamoeba keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. Ophthalmic Physiol Opt 2021; 41: 116-35.
 14. Mozayan A, Madu A, Channa P. Laser in-situ keratomileusis infection: review and update of current practices. Curr Opin Ophthalmol 2011; 22: 233-7.
 15. Carvalho FR, Foronda AS, Mannis MJ, Höfling-Lima AL, Belfort R Jr, de Freitas D. Twenty years of acanthamoeba keratitis. Cornea 2009; 28: 516-9.
 16. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite 2015; 22: 10.
 17. Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of Acanthamoeba keratitis using polymerase chain reaction analysis. Arch Ophthalmol 2000; 118: 178-83.
 18. Varacalli G, Di Zazzo A, Mori T, Dohlman TH, Spelta S, Coassin M, et al. Challenges in Acanthamoeba Keratitis: A Review. J Clin Med 2021; 10: 942.
 19. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. J Clin Microbiol 2001; 39: 1903-11.
 20. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28: E63.
 21. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Muro A. LAMP in Neglected Tropical Diseases: A Focus on Parasites. Diagnostics (Basel) 2021; 11: 521.
 22. Mthethwa NP, Amoah ID, Reddy P, Bux F, Kumari S. Fluorescence and colorimetric LAMP-based real-time detection of human pathogenic Cryptosporidium spp. from environmental samples. Acta Trop 2022; 235: 106606.
 23. Dirim Erdogan D, Aykur M, Selvi Gunel N, Palamar M, Barut Selver O, Ozel B, et al. The Risk Factors and Clinical Features of Acanthamoeba Keratitis: First Time Detection of Acanthamoeba T5 Genotype from Keratitis Patients in Turkey. Acta Parasitol 2022; 67: 1384-92.
 24. Cope JR, Ali IK, Visvesvara GS. 107 - Pathogenic and Opportunistic Free-Living Ameba Infections. In: Ryan ET, Hill DR, Solomon T, Aronson NE, Endy TP, editors. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition). London: Content Repository Only; 2020.p.814-20.
 25. Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B. Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? Trends Parasitol 2013; 29: 181-7.
 26. Mathers WD, Sutphin JE, Folberg R, Meier PA, Wenzel RP, Elgin RG. Outbreak of keratitis presumed to be caused by Acanthamoeba. Am J Ophthalmol 1996; 121: 129-42.
 27. Boggild AK, Martin DS, Lee TY, Yu B, Low DE. Laboratory diagnosis of amoebic keratitis: comparison of four diagnostic methods for different types of clinical specimens. J Clin Microbiol 2009; 47: 1314-8.
 28. Daas L, Viestenz A, Schnabel PA, Fries FN, Hager T, Szentmáry N, et al. Confocal microscopy as an early relapse marker for acanthamoeba keratitis. Clin Anat 2018; 31: 60-3.
 29. Kaufman AR, Tu EY. Advances in the management of Acanthamoeba keratitis: A review of the literature and synthesized algorithmic approach. Ocul Surf 2022; 25: 26-36.
 30. Rivière D, Szczębara FM, Berjeaud JM, Frère J, Hécharde Y. Development of a real-time PCR assay for quantification of Acanthamoeba trophozoites and cysts. J Microbiol Methods 2006; 64: 78-83.
 31. Zhang J, Cao J, Zhu M, Xu M, Shi F. Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect Mycoplasma ovipneumoniae. World J Microbiol Biotechnol 2019; 35: 31.
 32. Karakavuk M, Can H, Karakavuk T, Gül A, Alak SE, Gül C, et al. Rapid detection of Toxoplasma gondii DNA in cat feces using colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays targeting RE and B1 genes. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2022; 81: 101745.
 33. Momčilović S, Cantacessi C, Arsić-Arsenijević V, Otranto D, Tasić-Otašević S. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. Clin Microbiol Infect 2019; 25: 290-309.
 34. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, and Naegleria fowleri. J Clin Microbiol 2006; 44: 3589-95.
 35. Aykur M, Dagci H. Evaluation of molecular characterization and phylogeny for quantification of Acanthamoeba and Naegleria fowleri in various water sources, Turkey. PLoS One 2021; 16: e0256659.
 36. Koloren Z, Sotiriadou I, Karanis P. Investigations and comparative detection of Cryptosporidium species by microscopy, nested PCR and LAMP in water supplies of Ordu, Middle Black Sea, Turkey. Ann Trop Med Parasitol 2011; 105: 607-15.
 37. Koloren Z. Sensitive and cost-effective detection of Toxoplasma gondii in water supplies of the Black Sea in Turkey by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Biotechnology & Biotechnological Equipment 2013; 27: 3543-6.
 38. Kolören Z, Avcı C, Atlı Şekeroğlu Z. Diagnosis of Protozoa by Loop-Mediated Isothermal Amplification: (LAMP). Türkiye Parazitol Derg 2010; 34: 207-11.
 39. Yang HW, Lee YR, Inoue N, Jha BK, Danne DB, Kim HK, et al. Loop-mediated isothermal amplification targeting 18S ribosomal DNA for rapid detection of Acanthamoeba. Korean J Parasitol 2013; 51: 269-77.
 40. Ge Z, Qing Y, Zicheng S, Shiyong S. Rapid and sensitive diagnosis of Acanthamoeba keratitis by loop-mediated isothermal amplification. Clin Microbiol Infect 2013; 19: 1042-8.
 41. Lek-Uthai U, Passara R, Roongruangchai K, Buddhirakkul P, Thammaphalerd N. Rapid identification of Acanthamoeba from contact lens case using loop-mediated isothermal amplification method. Exp Parasitol 2009; 121: 342-5.
 42. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, et al. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Microbiol 2005; 43: 951-5.
 43. Khairnar K, Tamber GS, Ralevski F, Pillai DR. Comparison of molecular diagnostic methods for the detection of Acanthamoeba spp. from clinical specimens submitted for keratitis. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70: 499-506.
 44. Liu HY, Hopping GC, Vaidyanathan U, Ronquillo YC, Hoopes PC, Moshirfar M. Polymerase Chain Reaction and Its Application in the Diagnosis of Infectious Keratitis. Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol 2019; 8: 152-5.