

Toxoplasma gondii 529 baz çifti büyüklüğünde tekrar bölgesine (RE) özgü hızlı döngü aracılı izotermal amplifikasyon testinin geliştirilmesi ve analitik hassasiyetinin belirlenmesi

Development of Toxoplasma gondii 529 base pair size repeat region (RE) specific rapid loop mediated isothermal amplification test and determination of analytical sensitivity

Muhammet Karakavuk^{1,2} Hüseyin Can^{2,3} Tuğba Karakavuk^{2,4} Ceren Gül^{2,4}
Sedef Erkunt Alak^{2,3} Aytül Gül^{2,5} Aysu Değirmenci Döşkaya^{2,6} Cemal Ün³
Adnan Yüksel Gürüz^{2,6} Mert Döşkaya^{2,6}

¹ Ege Üniversitesi, Ödemiş Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, İzmir, Türkiye

² Ege Üniversitesi, Aşı Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

³ Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁴ Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁵ Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

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

ÖZ

Amaç: *Toxoplasma gondii* insan ve sıcakkanlı hayvanlarda hastalıklara neden olan bir protozoondur. Bu çalışmanın amacı toksoplazmozis tanısı için *T. gondii* tekrar bölgesine (RE) özgü primerlerin tasarlanması ile geliştirilen floresans esaslı hızlı Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) testinin analitik hassasiyetini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile elde edilen *T. gondii* RE, pCR2.1-TOPO vektörüne klonlanmıştır. Spesifik primerler kullanılarak geliştirilen LAMP testinin analitik hassasiyeti pCR2.1-RE vektörünün seri seyreltmeleri ile belirlenmiştir.

Bulgular: *T. gondii* RE genine özgü tasarlanan primerler ile geliştirilen LAMP testinin analitik hassasiyetinin ≤ 10 plazmit/reaksiyon olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: RE bölgesi *T. gondii* geni içinde 200-300 kere tekrar ettiğinden dolayı geliştirilen testin 0,05 takizoit/reaksiyon saptama limitine sahip olduğu hesaplanmıştır. LAMP testinin kolay, ucuz, hızlı ve saha koşullarına uygun olması ve diğer moleküler testlerden daha hassas olması nedeniyle umut verici olduğu öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Klonlama, LAMP, PZR, *T. gondii*, RE bölgesi.

ABSTRACT

Aim: *Toxoplasma gondii* is a protozoon that causes disease in humans and warm-blooded animals. The aim of this study is to determine the analytical sensitivity of the fluorescence-based rapid loop mediated isothermal amplification (LAMP) test developed by designing primers specific to *T. gondii* repeat region (RE) for the diagnosis of toxoplasmosis.

Materials and Methods: *T. gondii* RE obtained with PCR was cloned into vector pCR2.1-TOPO. The analytical sensitivity of the LAMP assay developed using specific primers was determined by serial dilutions of the pCR2.1-RE vector.

Results: It was determined that the analytical sensitivity of the LAMP test developed with primers designed specific to *T. gondii* RE gene was 10 copy plasmid / reaction.

Sorumlu yazar: Muhammet Karakavuk
Ege Üniversitesi, Ödemiş Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, İzmir, Türkiye
E-posta: muhammet.karakavuk@ege.edu.tr
Başvuru tarihi: 13.01.2021 Kabul tarihi: 08.07.2021

Conclusion: Since the RE region repeats 200-300 times in the *T. gondii* gene, the test developed has been calculated to have a detection limit of 0.05 tachyzoites/reaction. The LAMP test is predicted to be promising because it is easy, cheap, fast and suitable for field conditions and is more sensitive than other molecular tests.

Keywords: Cloning, LAMP, PCR, *T. gondii*, RE region.

GİRİŞ

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) hayvanlar ve insanlar enfekte edebilme özelliğine sahip, tıbbi önemi yüksek zorunlu hücre içi protozoon bir parazittir (1, 2). İnsanlarda toksoplazmozis, doku kistleri ile enfekte etlerin çiğ veya iyi pişirilmeden yenmesi ve ookistlerle kontamine olmuş yiyecek ya da içeceklerin tüketilmesiyle oluşur. Konjenital toksoplazmozis ise anneden fetüse takizoit formunun geçişi ile oluşmaktadır (3, 4).

İnsanlarda toksoplazmozis görülme sıklığı tüm dünyada %10-90 arasında değişmektedir. Toplumlar arası seroprevalans farklılıklarının beslenme alışkanlıklarına, toprak ve kedi dışkısı ile temasa ve kişisel hijyene bağlı olduğunu belirtilmektedir. Dünyada 500 milyon insan *T. gondii* ile enfektedir, Avrupa'da enfeksiyon doğurgan yaştaki kadınlarda %37 ile %58 arasında değişmektedir (5, 6).

Toksoplazmozis, güçlü immun sisteme sahip hastalarda genellikle asemptomatik seyrederken, immun sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden bulgulara neden olabilmektedir. Ayrıca, konjenital toksoplazmozis fetüste ölüme neden olacak klinik tablo oluşturabilir. Konjenital toksoplazmozis sırasında enfeksiyonun hamileliğin hangi döneminde yakalandığına bağlı olarak fetal hastalıkların şiddetinin değişebileceği gösterilmiştir (7). Doğuştan etkilenen bebeklerde yüksek ölüm oranına neden olmaktadır. *T. gondii* ile doğum öncesi enfeksiyon insidansının farklı ülkelerde 1000 doğumda 1 ile 10 arasında değiştiği ve üveit vakalarının yaklaşık %10-20'sinin bu parazitten kaynaklandığı tahmin edilmektedir (8, 9).

Toksoplazmozis tanısı rutin olarak serumdaki parazite özgü antikorların ELISA (Enzime bağlı immünosorbent testi), IFA (Immun floresan testi) gibi serolojik tekniklerle teşhis edilmesi ile yapılmaktadır. Konjenital toksoplazmozis, toksoplazmik retinokoroidit, AIDS hastalarının ve organ nakli alıcılarının kesin tanısında direkt tanı yöntemleri, serolojik tanıdan önde gelmektedir. Direkt tanı yöntemleri; *in vivo/in vitro* izolasyon, histolojik tanı ve PZR'dir. Bu yöntemler etkenin kendisinin ya da DNA'sının gösterilmesi için kullanılmaktadır. PZR testi, duyarlılık / özgüllüğünün yüksek olmasının yanında hızlı, kolay ve ucuz olması nedeniyle direkt tanı yöntemleri arasında en fazla tercih edilen yöntemdir (10).

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), enfeksiyonları teşhis etmede uygulanan nükleik asit çoğaltma testlerinin en yenilerinden biridir (11,12). LAMP; hızlı olması, sabit sıcaklıkta çalışması, yüksek hassasiyete sahip olması ve kontaminasyon riskinin az olması gibi önemli avantajlara sahiptir (13). Ayrıca, LAMP tekniği uygulanmasında gelişmiş laboratuvar ekipmanlarına ve deneyimli personele ihtiyaç yüksek değildir (11).

T. gondii tekrar bölgesi (RE), 529 baz çifti (bç) büyüklüğündedir ve genomda 200-300 kez tekrar etmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksek olup moleküler teşhiste yaygın olarak kullanılmaktadır (14,15). Bu çalışmada, *T. gondii* hızlı tanısı için RE spesifik floresans ışımaya prensibi ile çalışan LAMP testinin geliştirilmesi ve analitik hassasiyetinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Toxoplasma gondii LAMP primer setinin tasarlanması

T. gondii'ye özgü RE (GenBank numarası: AF146527) hedefleyen primer setleri PrimerExplorer V5 yazılımı (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo-1). Tasarlanan primerlerin tekrar bölgesine spesifik olduğu, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) BLAST programı kullanılarak (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kontrol edilmiştir.

Toxoplasma gondii RE'nin pCR 2.1. vektörüne klonlanması

T. gondii RE geni içerisindeki 210 bç'lik kısmı içeren plazmit kontroller, daha önceki çalışmamızda hücre kültüründe üretilen takizoitlerden elde edilen *T. gondii* pozitif DNA örnekleriyle oluşturulmuştur (16).

Öncelikle RE bölgesi tasarlanan dış primerler olan F3 ve B3 primerleri kullanılarak PZR ile izole edilmiştir. Kısaca; PZR reaksiyonunda 10 ng genomik DNA ve her biri 0,5 µM primerler, 1.25 U TaqDNA polimeraz (Thermo, ABD), 0,2 mM dNTP ve 1xTaqDNA polimeraz reaksiyon tanponu kullanılarak tarif edilen PCR protokolü ile izole edilmiştir. 95°C'de 10 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, 30 sn 95°C, 30 sn 56°C ve 30 sn 72°C'lik 40 döngü ve son uzama basamağı 72°C'de 10 dk uygulanmıştır. Reaksiyon sonucunda PZR ürünü PZR saflaştırma kiti (Qiagen, Almanya) ile üretici firma protokolüne göre saflaştırılmıştır.

Saflaştırılmış PZR ürünü pCR 2.1.- TOPO (Invitrogen, ABD) vektörüne üretici firmanın protokolüne uygun olarak klonlanmıştır. Klonlama işlemi kısaca; 1 µl PZR ürünü, 1 µl vektör, 1 µl tuz solüsyonu ve 3 µl moleküler özellikte distile su karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 50 µl TOP10 *E. coli* kompetent hücreleri (Invitrogen, ABD) eklenmiştir ve buzda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışıma 30 sn 42°C'de ısı şoku uygulanmış ve hızlıca 250 µl SOC (süper optimal katabolizer) besiyeri eklenip 225 rpm'de 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler, 50 µg/ml kanamisin içeren LB-Agar plaklara ekilmiştir ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bir gün sonunda plaklarda oluşan kolonilerden tek koloni seçilerek kanamisin içeren 3 ml LB besiyerine ekilmiş ve 225 rpm'de 37°C'de 1 gün inkübe edilmiştir. Elde edilen kolonilerden plazmit saflaştırması kit protokolüne uygun olarak (Qiagen, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma sonrası klonlama PZR ve sekanslama ile doğrulanmıştır (17,18). Doğrulanmış plazmitlerin analitik hassasiyetinin belirlenmesi amacıyla her reaksiyonda 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 - 10^0 plazmit kopya olacak şekilde distile su ile seyreltilmiştir. Testte negatif kontrol olarak distile su kullanıldı (17, 18).

Toxoplasma gondii RE'nin analitik hassasiyeti

Sulandırılan plazmitler ile New England Biolabs (NEB, ABD) WarmStart LAMP Kit (DNA&RNA) kullanılarak LAMP reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kısaca; 2,5 µl primer karışımı (FIP ve BIP 1,6 µM; F3 ve B3 0,2 µM; LF ve LB 0,4 µM), 12,5 µl WarmStart LAMP 2X Master Mix, 0,5 µl floresan boya, 1 µl DNA ve 8,5 µl moleküler özellikte distile su olacak şekilde reaksiyon hazırlanmıştır. Reaksiyon 60°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. 60 dakika sonunda UV altında izlenmiş ve %1 agaroz jelde görüntülenmiştir.

BULGULAR

Primer Tasarlanması ve BLAST sonuçları

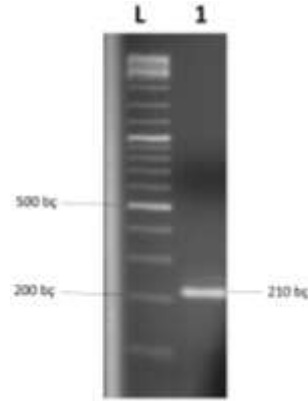
PrimerExplorer V5 programı kullanılarak tasarlanan *T. gondii*'ye RE bölgesine özgü primerler Tablo-1'de gösterilmiştir. Primerlerin amplifiye ettiği tekrar bölgesi kısmı NCBI BLAST programı ile taranmıştır. Tarama sonucunda *T. gondii* ile %100 benzediği ve diğer kedi paraziti olan *Hammondia hammondi* ile %87 oranında benzediği ortaya konmuştur. Bunun dışında başka bir parazitte benzerlik saptanmamıştır.

Toxoplasma gondii RE içeren pozitif kontrol plazmiti

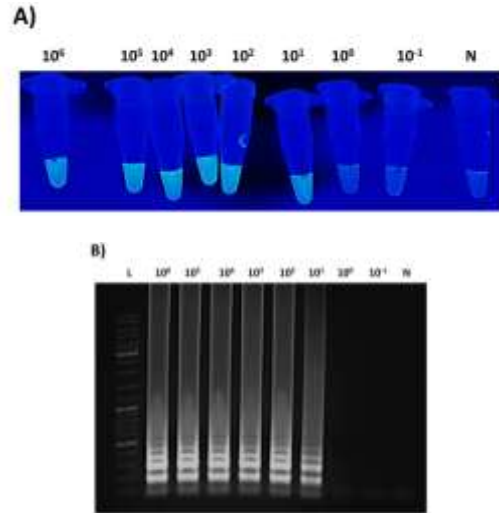
Elde edilen pCR 2.1-RE plazmitinin doğrulanması, PZR ve sekanslama ile gerçekleştirilmiştir. RE içeren plazmitlerin kalıp DNA olarak kullanıldığı PZR sonucunda elde edilen 210 bç büyüklüğündeki ürün Şekil-1'de gösterilmiştir.

Tablo-1. LAMP testi için tasarlanan primerler.

PRİMER	SEKANS (5'- 3')
F3	AAGGCGAGGGTGAGGATG
B3	CCAAGCCTCCGACTCTGT
FIP	CAGGAAAAGCAGCCAAGCCG-GTTGGGAAGCGACGAGAG
BIP	AGAGACACCGGAATGCGATCCA-GCCCTCTTCTCCACTCTTCA
LF	AAACATCTTCTCCCTCTCCGA
LB	CGCTTTCCTCGTGGTGATG



Şekil-1. Hazırlanan plazmitin PZR ile doğrulanması, L: Ladder, Sıra 1: 210 bç PZR ürünü.



Şekil-2. A) LAMP reaksiyonunun UV altında floresan parlama görüntüsü (Seri seyreltme ile reaksiyona eklenen plazmit miktarı tüplerin üzerine yazılmıştır, N: Negatif kontrol), B) Reaksiyonun %1 agaroz jelde görüntülenmesi (L: Ladder, Sütunlar üzerine seri sulandırma ile reaksiyona eklenen plazmit miktarı sütünlara yazılmıştır, N: Negatif kontrol).

Analitık hassasıyet

Geliştirilen testin analitik hassasıyetinin saptamasında, pCR 2.1-RE pozitif kontrol plazmitleri her reaksiyon için 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 kopya plazmit olacak şekilde seyreltildi ve ardından yapılan LAMP testi sonucunda testin analitik hassasıyetinin ≤ 10 plazmit/reaksiyon olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar hem floresans ışması ile (Şekil-2A) hem de %1 agaroz jelde (Şekil-2B) gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Toksoplazmozis başta hamile insanlarda olmak üzere çok çeşitli klinik bulgulara sahip paraziter bir hastalıktır. Hastalığın teşhisinde şu an en çok ELISA tabanlı serolojik ve PZR tabanlı moleküler testler kullanılmaktadır. Ülkemizde moleküler tanı daha çok üst seviye sağlık kurumlarında yapılabilmektedir. Bu nedenle hastalığın hızlı, doğru, ucuz ve saha koşullarına uygun bir tanı yöntemi geliştirilmesi ülkemiz için oldukça önemlidir. LAMP testi olağan üstü avantajlara sahip olup diğer geleneksel tespit yöntemlerine göre özgüllüğü son derece yüksektir. Teste 4 primer hedefin 6 farklı bölgesi için özel olarak tasarlanmaktadır. Teorik olarak primerlerden biri tam olarak eşleşmediğinde reaksiyonun gerçekleşmediği için oldukça hassas bir testtir. Ayrıca LAMP testleri geleneksel PZR testlerinden 10-100 kat daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Testin tek bir ısı derece gerçekleşmesi nedeniyle termal döngü cihazına ihtiyaç duymaması, testin yorumlanması için jel elektroforez veya spesifik proplara ihtiyaç duymaması nedeniyle oldukça maliyet etkin bir test olduğu ortaya konulmuştur (19). Bu çalışmada, *T. gondii* RE'ye özgü LAMP primerleri tasarlanarak hızlı bir LAMP testi geliştirilmesi amaçlanmıştır. *T. gondii* genomunda 200-300 kere tekrar etmesi ve klinik örneklerde daha önce çalışılmış olması nedeniyle bu gen bölgesi seçilmiştir (20).

T. gondii LAMP çalışmaları ilk olarak su örneklerinde yapılmıştır. Çalışmada B1 ve TgOWP gen bölgesine spesifik primerler tasarlanmış LAMP uygulanarak immün floresan antikor testi (IFA) ve PZR ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilen testin hassasıyetinin 0,5 takizoit olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca LAMP testinin hem PZR'den hem de IFA'dan daha hassas olduğu belirlenmiştir (21).

Daha önce yapılan çalışmalarda *T. gondii* RE hassasıyeti PCR ile 10 pg, LAMP ile 1 pg olarak tespit edilmiştir. Çalışmada 1 pg'nin 1 takizoit olduğu belirtilmiş ve geliştirilen testin hassasıyetinin 1 takizoit olduğu ve PZR'ye göre 10 kat hassas olduğu tespit edilmiştir (13,20). Yapılan diğer bir çalışmada *T. gondii* B1 gen bölgesine özgü 6 farklı primer setleri tasarlanmış testin hassasıyetinin 2-3 takizoit olduğu ortaya konmuştur (22). Nested PZR ile karşılaştırılması

yapılan diğer bir çalışmada *T. gondii* RE ve B1 genlerine özgü primerler kullanılarak LAMP gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda LAMP testlerinin, nested PZR'ye göre RE bölgesinde 1000 kat, B1 gen bölgesinde ise 100 kat daha hassas olduğu tespit edilmiştir (23).

Çalışmamızda geliştirdiğimiz testin hassasıyeti 10 kopya plazmit/reaksiyon olarak bulunmuştur. *T. gondii* RE geni 1 takizoit içinde en az 200 kere tekrar etmektedir. Bu nedenle bizim testimizin saptama limitinin 0,05 takizoit olduğu hesaplanmaktadır.

T. gondii RE, *T. gondii*'yi diğer parazitlerden (*Echinococcus granulosus*, *Giardia duodenalis*, *P. falciparum*, *Sarcocystis* spp. *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis* and *N. caninum*) ayırdığı daha önceki çalışmalarda doğrulanmıştır (15). Ayrıca, LAMP testi, ilk aşamalarda dört primer (F3, B3, FIP ve BIP) ve sonraki aşamalarda iki primer (FIP ve BIP) olmak üzere toplam 6 primer ile çalıştığı için daha yüksek hassasıyete sahiptir (20, 24).

LAMP'ın ek bir avantajı; DNA amplifikasyonunun, reaksiyon karışımının bulanıklığının veya floresansının görsel olarak incelenmesiyle veya LAMP reaksiyonun gerçek zamanlı türbidimetre ile kolayca tespit edilebilmesidir (11-13, 20). Ayrıca pozitif LAMP reaksiyonunda pH değişiminin fenol red, nötral red ya da ksilenol orange gibi indikatör boyaların renk değişimleri ile de saptanabilmektedir (25). Görsel olarak hastalıkların moleküler teşhisinin yapılması tahlil süresini azaltmakta, jel elektroforeze olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır. Bu fenomenler LAMP ürünlerinin kolay ve hızlı bir şekilde görsel olarak tanımlanmasına izin vermekte ve LAMP'ın hem saha koşullarında hem de kaynak azlığı bulunan fakir ülkelerde hızlı bir tanı aracı olarak uygulanmasını kolaylaştırmaktadır (12, 13, 20).

SONUÇ

LAMP testi, *T. gondii* enfeksiyonunu teşhis etmekte kullanılabilecek basit, ucuz, yüksek hassasıyete sahip umut verici bir tekniktir. LAMP testi ve sonuçların hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için minimum ekipman gerekmesi, teknik, mevcut testlere alternatif olarak Türkiye gibi toksoplazmozisin endemik olduğu ülkelerde büyük potansiyele sahiptir. Bu nedenle, LAMP testi klinik örneklerde çalışılarak mevcut rutin kitlere alternatif kit geliştirmesi araştırılmalıdır.

Teşekkür: Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TGA-2020-22182 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çıkar çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Dubey J., Miller N., J.K F. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med.* 1970; 132 (4): 636–62.
2. Karakavuk M, Aldemir D, Mercier A, Şahar EA, Can H, Murat JB, et al. Prevalence of toxoplasmosis and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated in wild birds of prey and their relation with previously isolated strains from Turkey. *PLoS One.* 2018; 13 (4): 1–17.
3. Rajendran C, Su C, Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect Genet Evol.* 2012; 12 (2): 359–68.
4. Velmurugan G V., Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol.* 2008; 155 (3–4): 314–8.
5. Harma M, Harma M, Güngen N, Demir N. Toxoplasmosis in pregnant women in Şanlıurfa, Southeastern Anatolia City, Turkey. *J Egypt Soc Parasitol.* 2004; 34: 519–25.
6. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: A global reassessment. Part I: Epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol.* 2003; 136 (6): 973–88.
7. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis.* 2009; 199 (2): 280–5.
8. Fallahi S, Kazemi B, Seyyed tabaei SJ, Bandehpour M, Lasjerdi Z, Taghipour N, et al. Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection in children with cancer. *Parasitol Int [Internet].* 2014; 63 (1): 37–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.08.005>
9. Yuan Z, Gao S, Liu Q, Xia X, Liu X, Liu B, et al. *Toxoplasma gondii* antibodies in cancer patients. *Cancer Lett.* 2007; 254 (1): 71–4.
10. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (3): 941–5.
11. Kolören Z, Avşar C, Şekeroğlu ZA. [Diagnosis of protozoa by loop-mediated isothermal amplification: (LAMP)]. *Türkiye Parazitol Derg.* 2010; 34 (4): 207–11.
12. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res [Internet].* 2000; 28 (12): e63.
13. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002; 16 (3): 223–9.
14. Edvinsson B, Lappalainen M, Evengård B, Buffalano W, Ferguson D, Guy E, et al. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12 (2): 131–6.
15. Homan W., Vercammen M, Braekeleer J De, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000; 30 (1): 69–75.
16. Sağlam Metiner P, Can H, Ayyıldız Tamiş D, Karakavuk M, Kımız Geboloğlu I, Gülçe İz S, et al. The use of *Toxoplasma gondii* tachyzoites produced in HeLa cells adhered to Cytodex 1 microcarriers as antigen in serological assays: an application of microcarrier technology. *Cytotechnology.* 2019; 71 (1): 91–105.
17. Can H, Inceboz T, Caner A, Atalay Şahar E, Karakavuk M, Döşkaya M, et al. Kist Örneklerinde Yeni Bir Tek Tüp Multipleks Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu He *Echinococcus granulosus* ve *Echinococcus multilocularis*' in Saptanması. *Mikrobiyol Bul.* 2016; 50 (2): 266–77.
18. Döşkaya M, Caner A, Değirmenci A, Wengenack NL, Yolasiğmaz A, Turgay N, et al. Degree and frequency of inhibition in a routine realtime PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in Turkey. *J Med Microbiol.* 2011; 60 (7): 937–44.
19. Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog [Internet].* 2017; 107: 54–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.016>
20. Zhang H, Thekisoe OMM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N, et al. *Toxoplasma gondii*: Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Exp Parasitol [Internet].* 2009;122(1):47–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.01.012>
21. Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet].* 2008; 62:357–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.009>
22. Yang Q, Zhang R, Wu H, Zhang Y, Wang K. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Chinese J Parasitol Parasit Dis.* 2008; 26 (4): 304–6.
23. Fallahi S, Mazar ZA, Ghasemian M, Haghighi A. Challenging loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for molecular detection of *Toxoplasma gondii*. *Asian Pac J Trop Med [Internet].* 2015;8(5):366–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645 \(14\) 60345-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645 (14) 60345-X)
24. Iwasaki M, Yonekawa T, Otsuka K, Suzuki W, Nagamine K, Hase T, et al. Validation of the loop-mediated isothermal amplification method for single nucleotide polymorphism genotyping with whole blood. *Genome Lett.* 2003; (2): 119–26.