VETERINARY AND ZOOTECHNICAL SCIENCES

DERLEME MAKALESİ REVIEW ARTICLE

Veteriner Mikrobiyolojide Real Time PCR

Ayşe Rümeysa NALÇA[1], Timur GÜLHAN[2]*

[1]Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Sivas Türkiye
[2]Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun Türkiye

rmysa.ayse55@gmail.com
ORCID: 0000-0002-3947-6511
timur.gulhan@omu.edu.tr*(Corresponding Autor)
ORCID: 0000-0003-4798-1427

***Basım/Published**:25.07.2025*

Atıf yapmak için: **Nalça, AR ve Gülhan, T (2025)** Veteriner Mikrobiyolojide Real Time PCR *VZS, 1*(1), 60-76.
How to cite: **Nalça, AR ve Gülhan, Ç (2025)** Real-Time PCR in Veterinary Microbiology *VZS, 1(1), 60-76.*

Özet: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik mikroorganizmaların hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlayan nükleik asit bazlı bir tekniktir. Temel olarak bir hedef DNA dizisinin milyonlarca kopyasının enzimatik sentezinden oluşur. PCR, hayvanlarda bulaşıcı hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde oldukça önemli epidemiyolojik veri kaynağı oluşturmaktadır. Yöntem çok sayıda uygulamada yaygın olarak kullanılmakla birlikte, mikrobiyoloji ve bulaşıcı hastalıkların teşhisinde son yıllarda olağanüstü ilerlemeler kaydetmiştir. Pek çok mikrobiyal patojeni tanımlamada kullanılan konvansiyonel kültür tekniği yavaş ve zahmetlidir. Tanı amaçlı birçok yararlı nükleik asit probu ve immünolojik analizlerler geliştirilmesine rağmen bazı eksiklikleri de vardır. PCR, kontaminantların ve inhibitörlerin neden olduğu problemler veya spesifik primerlerin tasarlanması için uygun sekansların eksikliği gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu derlemede, RT-PCR yöntemleri, veteriner mikrobiyolojideki kullanımı ve konvensiyonel PCR ile karşılaştırılması ele alandı.

Anahtar Kelimeler: Konvensiyonel PCR, RT-PCR; Veteriner mikrobiyoloji

Real-Time PCR in Veterinary Microbiology

Abstract: The polymerase chain reaction (PCR) is a nucleicacid-based technique that enables the rapid and sensitive detection of specific microorganisms. The technique consists basically of the enzymatic synthesis of millions of copies of a target DNA sequence. PCR is likely to have a strong

impact in the epidemiologic, treatment and prevention of animal infectious diseases. Although PCR is widely used in an increasing number of applications, those in the area of microbiology, and diagnosis of infectious diseases have under gone outstanding advances in recent years. The conventional culture technique used to identify many microbial pathogens is slow and labour intensive. Many useful nucleic acid probes and immunological assays have been developed for diagnostic purposes, but these techniques also have some deficiencies. PCR has some short comings, such as problem caused by contaminants and inhibitors, or lack of appropriate sequences for designing specific primers. In this review, RT-PCR methods, their use in veterinary microbiology and comparison with conventional PCR were discussed.

Keywords: Conventional PCR; RT-PCR; Veterinary microbiology

GİRİŞ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak in vitro ortamda çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Bu teknik 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. PCR kalıtsal hastalıkların tespiti, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplama gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Matsuda, 2017).

Rutin PCR kullanımını sağlayan önemli yenilik, *Thermus aquaticus*'tan (Taq polimeraz) termostabil polimerazın kullanılması olmuştur. Bu gelişme in vitro spesifik enzimatik amplifikasyon için PCR'nin dünya çapında tanınmasına yol açmıştır. PCR buluşu, biyolojinin çeşitli alanlarında araştırmayı büyük ölçüde arttırmış ve bu teknoloji, birçok araştırma alanında mevcut bilgi seviyesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur.

PCR kullanımındaki en önemli dönüm noktası, floresansın izlenmesi yoluyla DNA amplifikasyonunun gerçek zamanlı izlenmesi kavramının getirilmesi olmuştur. Bununla birlikte, geleneksel PCR zaten araştırma laboratuvarlarında önemli bir araç haline getirilmiştir. Fakat RT-PCR daha hızlı, hassas ve tekrarlanabilir olmasının yanında kontaminasyon riskini de en aza indirmektedir. Günümüzde RT-PCR, gıdalardaki nükleik asitleri, gen terapi protokollerinde kullanılan vektörleri, genetik olarak modifiye edilmiş

organizmaları tespit etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Kralik ve Ricchi, 2017).

Real-time PCR, patojenleri teşhis etmek için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında devrim yaratmıştır. Bu test yöntemi PCR kimyasını, aynı reaksiyon kabındaki amplifiye edilmiş ürünün floresan prob tespiti ile birleştirmiştir. Genel olarak, hem PCR hem de amplifiye ürün tespiti bir saat veya daha kısa sürede tamamlanmaktadır, bu da geleneksel PCR ve tespit yöntemlerinden önemli ölçüde daha hızlı olduğunu göstermiştir. Yüksek hassasiyeti, yüksek spesifitesi, hızlı sonuç vermesi ve performans kolaylığı RT-PCR'yi geleneksel kültür ve antijen bazlı testler için çekici yöntem haline getirmiştir (Espy ve ark., 2006).

Real-Time PCR

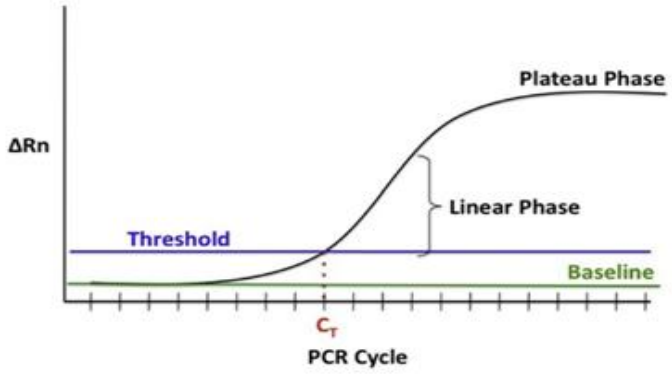
Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu, bir hedef DNA sekansının veya ilgilenilen bir genin spesifik nükleotit sekansının ekspresyon seviyesini ölçmek için kullanılan analitik bir araçtır. Kantitatif real-time PCR kinetik PCR olarak da adlandırılır. Real-time PCR'de DNA'nın amplifikasyonu, reaksiyondaki PCR ürününün miktarı ile doğru orantılı olarak artan bir floresan raportör sinyalinin saptanması ve nicelendirilmesi ile izlenir. Sistem, amplifiye ürünün izlenmesine izin veren boyaların veya floresan probların kullanımına dayanır (Green ve Sambrook, 2018).

Real-time PCR yöntemi, normal PCR reaktiflerine (Taqpolimeraz, primerler, dNTP'ler ve tamponlama reaktifleri) ek olarak floresan belirteçlerin kullanılmasını gerektirir. Bunlar, spesifik bir nükleotit sekansına bağlanan oligonükleotidprobları veya PCR döngüleri sırasında ortaya çıkan herhangi bir çift sarmallı DNA'ya bağlanan boyalar şeklinde olabilen kimyasal markerlardır. TaqMan gibi prob bazlı analizlerde, floresan sinyal emisyonu, prob hedefe özgü nükleotit sekansı ile etkileşime girdiğinde meydana gelir. Öte yandan SYBR Green adı verilen boya, herhangi bir çift sarmallı nükleotit sekansı ile temas ettiğinde floresan sinyali yayar. Floresan boya herhangi bir çift sarmallı nükleotit sekansına bağlandığından, her zaman primerdimerlerin, saç tokası halkalarının veya spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasına izin verdiğinden yanlış sinyallerin saptanması endişesi vardır. Bununla birlikte araştırmalar, uygun real-time PCR protokolü izlendiğinde

ve primerler dikkatle tasarlandığında, SYBR Green tabanlı tespit deneylerinin TaqMan ile aynı yüksek performanslı sonuçları elde ettiğini, ancak daha az kurulum ve işletme maliyeti ile gerçekleştirdiğini göstermiştir. SYBR Green tabanlı testlerin kullanımının düşük maliyetli olması onları birçok laboratuvar için daha cazip hale getirmektedir (Matsuda, 2017).

En popüler real-time PCR yöntemi SYBR Green I gibi DNA'ya bağlanan boyalara dayanmaktadır. Boya floresanı sadece çift sarmallı DNA varlığında üretir. Böylece araştırmacılar amplikonların konsantrasyonunu izleyebilirler. Bu yöntemin bir başka özelliği tipik olarak PCR tamamlandıktan sonra gerçekleştirilen erime eğrisi analizidir (MCA). Floresan izlenirken numune yavaşça ısıtılır. Yüksek sıcaklıklarda, çift sarmallı DNA amplikonları tek sarmallı (eriyik) hale dönüşmeye başlar ve sonuç olarak floresans genliği düşer. DNA'nın çift sarmallı halden tek sarmallı hale dönüştüğü sıcaklığa erime sıcaklığı (TM) denir.

Bir başka popüler real-time PCR yöntemi, 6-carboxy-fluorescein (FAM) gibi bir proba dayanmaktadır. Bu probun kimyasal olarak TAMRA gibi bir söndürücünün yanındaki oligonükleotidlere bağlanması gerekir. Bu PCR yöntemine genellikle TaqManprob yöntemi denir. Primerler DNA kalıbına bağlandıktan sonra söndürücü tipik olarak florofordan ayrılır ve floresans genliği artar. Bu yöntem gene özgüdür ancak oligonükleotidlerin bağlı boya ve bir söndürücü ile sentezlenmesini gerektirir. Floresans rezonans enerji transferi (FRET) tabanlı yöntemler de popülerdir (Ahrberg ve Neužil, 2015). Işık emisyon analizi, her PCR döngüsünden sonra elde edilen absorpsiyon ile bir grafik oluşturan ışık sinyali detektörü tarafından yapılır. Üretilen sinyal oluşturulan ürün miktarını yansıtır. Real-time PCR sonuçları, termal döngüleyicide üretilen birbirine bağlı bilgisayar grafikleri aracılığıyla kaydedilir. Temel olarak dört çeşit analiz gerçekleştirilir: amplifikasyon eğrisi, ayrışma eğrisi, spektrum ve bileşen (Mackay ve Landt, 2007). Geliştirilen herhangi bir yapı kullanılarak, PCR reaksiyonu sırasında floresan emisyonundaki artış, modifiye edilmiş bir termosikler ile gerçek zamanlı olarak tespit edilebilir. Bilgisayar yazılımı, PCR amplifikasyonu sırasında toplanan floresan emisyon verilerini kullanarak amplifikasyon grafikleri oluşturur (Şekil 1).



Şekil 1. Real-time kantitatif PCR'de yaygın olarak kullanılan terminolojiyi gösteren tekbir amplifikasyon grafiğinin modeli

Baseline: Bir raportör floresan sinyalinin biriktiği ancak cihazın algılama limitlerinin altında olduğu PCR döngüleri olarak tanımlanır. Varsayılan olarak, bilgisayar yazılımı taban çizgisini 3 ila 15 döngü arasında ayarlar ancak bunun sıklıkla manuel olarak değiştirilmesi gerekir.

ΔRn: Bir bilgisayar yazılım programı, Rn = Rnf -Rnb denklemini kullanarak bir ΔRn hesaplar; burada Rnf, her zaman noktasında ürünün floresan emisyonudur. Rnb ise taban çizgisinin floresan emisyonudur. ΔRn değerleri döngü sayısına göre çizilir. PCR amplifikasyonunun ilk döngüleri sırasında, ΔRn değerleri taban çizgisini aşmaz.

Threshold: Bilgisayarlar tarafından, taban çizgisinin değişkenliğine bağlı olarak rastgele bir eşik seçilir. 3 ila 15 döngü arasındaki başlangıç floresanının standart sapmasının on katı olarak hesaplanır. Eşiğin üzerinde tespit edilen bir floresan sinyali, bir numune için eşik döngüsünü (Ct) tanımlamak için kullanılabilecek gerçek bir sinyal olarak kabul edilir.

Ct: Raportör floritesinin minimum tespit seviyesinden daha yüksek olduğu fraksiyonel PCR döngü sayısı olarak tanımlanır. Ct, real-time PCR'nin temel bir prensibidir aynı zamanda doğruluk ve tekrarlanabilir veri üretiminde önemli bir bileşendir. Ct değeri her zaman, PCR'nin erken döngüleri sırasında meydana gelen hedef amplifikasyonun üstel fazı sırasında ortaya çıkar. Reaksiyon bileşenleri sınırlandıkça, PCR reaksiyonu artık üssel bir hızda (plato fazı) kalıp üretmeyene ve PCR ürününde çok az artış olana veya hiç artış olmayana kadar hedef amplifikasyon oranı azalır. Bu, Ct'nin başlangıç kopya sayısının,

biriken PCR ürünü miktarının bir uç nokta ölçümünden daha güvenilir olmasının ana nedenidir (Arya ve ark., 2005).

Real-time PCR nükleik asit dizilerinin (DNA veya RNA) nicelleştirilmesi için klinik ve biyolojik alanlarda yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu PCR ürününe dahil edilen floresan boyalar kullanılarak reaksiyon sırasında DNA miktarının izlendiği hassas ve spesifik bir tekniktir. Floresan sinyalindeki artış, üretilen PCR ürün moleküllerinin sayısı ile doğru orantılıdır. Bir qPCR reaksiyonu yoluyla floresan izleme, SYBR Green gibi spesifik olmayan boyalar veya hidroliz probları, moleküler işaretler, floresan rezonans enerji transfer (FRET) probları ve scorpionprimerleri dahil, diziye özgü primerler veya problar ile tespit edilebilir. SYBR Green boyası ve TaqMan hidroliz probları, qPCR protokollerini geliştirmek için en sık kullanılan yöntemlerdir.,

Geliştirilen real-time PCR protokolünün herhangi birindeki başarı, tasarlanan primerlerin ve probların uygunluğuna bağlıdır çünkü tekniğin spesifitesi, primerlerin tamamlayıcı hedeflerine bağlanması ve daha sonra yeni sentezlenmiş DNA'ya probhibridizasyonu ile yakından ilişkilidir. SYBR Green analizlerinde, primerlerin uygun tasarımı özellikle önemlidir çünkü boya, spesifik ve spesifik olmayan real-time PCR ürünleri arasında ayrım yapmadan çift sarmallı DNA'ya bağlanır. Halihazırda mevcut olan real-time PCR cihazlarının ve sinyal iletim sistemlerinin önemli bir avantajı, PCR amplikonunun erime sıcaklığı ve/veya prob hibridizasyonu analizi ile karakterize edilebilmesidir. Diğer kantitatif PCR yöntemlerinden farklı olarak real-time PCR, PCR sonrası bir işlem gerektirmez, potansiyel PCR ürünü aktarım kontaminasyonunu önler ve çok daha hızlı ve daha yüksek verimli testler ile sonuçlanır. Real-time PCR yöntemi, hedef molekül belirlemenin başlatılması için çok geniş bir dinamik aralığa sahiptir. Real-time PCR mevcut kantitatif PCR yöntemlerinden son derece hassas ve daha az emek ister (Matsuda, 2017).

Real-Time PCR'nin Mikrobiyolojide Kullanımı

Patojenlerin hızlı, spesifik ve hassas tespiti, anında terapötik müdahale, potansiyel salgın hastalıkların kontrolü için gereklidir ve özellikle sistemik enfeksiyonları veya bağışıklık bozuklukları olan hastaların sonuçları üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Patojenik mikroorganizmaların saptanması ve tanımlanması, klinik mikrobiyolojide kültür bazlı testlerin özü olmasına rağmen; patojenlerin kantitatif ölçümlerinin önemi artmış ve

antibiyotiklerin etkinliğini izlemek için genişletilmiştir. Son zamanlarda, patojenik mikroorganizmaların ve bunların aktivitelerinin ölçümü, hızlı tespiti ve tanımlanması önemli hale gelmiştir.

Son moleküler teşhis teknolojilerinin ve mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki uygulamalarının geliştirilmesinden önce, mikroorganizmaların nitelendirilmesi ve nicelendirilmesi için geleneksel teşhis yöntemleri kullanılmıştır. Tek tek hücrelerin numunelerden veya kültür plaklarından mikroskopi ile doğrudan sayılması, muhtemelen mikrobiyal miktar tayini için kullanılan en eski tekniklerden biri olmuştur. DNA bağlama boyaları da aynı amaçla kullanılmıştır. Floresan etiketli antikorlar, rRNA (ribozomal RNA) hedefli floresan oligonükleotitler, konfokal lazer tarama mikroskopisi ve akış sitometrik yöntemleri dahil olmak üzere birçok farklı hücre tespit tekniği geliştirilmiştir. Geleneksel yöntemler arasında kültür ve kültür temelli yöntemler güvenilir yaklaşımlar olarak kabul edilmiş ve çoğunlukla bakterilerin tanımlanması ve nicelendirilmesi için "altın standart" olarak tarif edilmiştir. Zaman alıcı olmanın yanı sıra, geleneksel yöntemlerin zayıf duyarlılık, yavaş büyüyen ve kültürlenemeyen organizmalar, dar tespit aralıkları, karmaşık yorumlama, yüksek arka plan seviyeleri ve spesifik olmayan çapraz reaksiyonlar gibi bazı sınırlamaları vardır. Geleneksel mikrobiyal kültür yöntemleri, daha ileri çalışmalar ve epidemiyolojik değerlendirmeler için özellikle yeni, karakterize edilmemiş veya atipik organizmalar için değerli veriler sağlamıştır.

Real-time PCR teknolojisi PCR tabanlı sistemler arasında büyük bir gelişme olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde, PCR gerçekleştikçe floresan sinyaller üretilir ve bu nedenle amplifikasyon sırasında gerçek zamanlı izleme mümkündür. Nükleik asit amplifikasyonu ve sinyal saptamanın bu yararlı kombinasyonu, nükleik asit saptaması için gereken süreyi azaltmıştır. Bu teknolojinin artan hassasiyeti, kullanım kolaylığı ve çabukluğu onu mikroorganizmaların saptanması için çekici bir alternatif haline getirmektedir (Valones ve ark., 2009).

Real-time PCR sistemleri klinik mikrobiyolojiye önemli avantajlar getirmiştir. Real-time PCR uygulamaları, patojenlerin saptanması, nicelendirilmesi ve mikroorganizmalardaki spesifik genlerin veya mutasyonların tanımlanması için zaman ve maliyet açısından etkili olmuştur. Real-time PCR uygulamaları, konvansiyonel tespit ve seroloji sonuçlarının hızlı bir şekilde doğrulanmasını, spesifik olmayan serolojik yanlış

pozitif sonuçların düzeltilmesini, virülans faktörlerini veya antimikrobiyal direnci kodlayan genlerin tanımlanmasını, antimikrobiyal dirençle ilişkili genlerin mutasyonlarının tanınmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, uygun antibiyotik tedavisine daha erken başlamak veya bir kültür-negatif veya seroloji-negatif örnekten moleküler bir tanımlama veya tedavi sırasında patojenin kantitatif olarak izlenmesi durumunda tedaviyi daha erken değiştirmek mümkün olabilir (Matsuda, 2017).

***Mycoplasma bovis* Enfeksiyonları**

Mikoplazmalar kendini kopyalayabilen, oldukça zor gelişen, kültürlenmesi zor ve yavaş büyüyen en küçük serbest yaşayan mikroorganizmalardır. Mikoplazmalar dünya çapında sığır mastiti, solunum hastalığı ve üreme bozukluklarına neden olmaktadır.

M. bovis, dünya çapında sığırlarda solunum yolu hastalığı, orta kulak iltihabı, mastitis, artrit ve diğer çeşitli hastalıklara neden olan en önemli patojenlerden biridir. Sığırlarda ve mandalarda *M. bovis* ile ilişkili mastitis prevalansı, küresel olarak giderek artan bir sorun olarak kabul edilmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yüksek morbidite oranları ve sonuçta ortaya çıkan ekonomik kayıplar etkilenen sığır ve manda çiftliklerine zarar vermektedir. Teşhis, organizmanın klinik örneklerden izole edilmesi ve tanımlanmasıyla gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, organizmanın titiz doğası, diğer kontaminant bakterilerin aşırı büyümesi ve sonuçsuz biyokimyasal testler geleneksel bakteri tanımlama yöntemlerini rutin teşhis amaçlı uygun hale getirir. Real-time PCR, bir sürüdeki aktif enfeksiyonu tespit etmenin çok yararlı bir yoludur. Ayrıca organizmaları doğrudan klinik örneklerden tanımlamak için nükleik asit bazlı teşhis testleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan DNA bazlı teknikler PCR, multiplex PCR, nested PCR, PCR-RFLP ve LAMP (Loop Aracılı İzotermal Yöntem)'tır.

Geleneksel PCR tabanlı tespit sistemlerine göre avantajları dikkate alınarak *M. bovis* tanısı için çeşitli prob tabanlı real-time PCR deneyleri geliştirilmiştir (Behera ve ark., 2018).

M. bovis enfeksiyonunun hızlı teşhisi, hastalığın önlenmesi ve etkili kontrolü için önemlidir. Kültür ile teşhis hem zaman alıcı hem de karmaşıktır, çünkü *M. bovis*'in görünür koloniler üretmesi 3-10 gün gerektirir. Sonrasında ise izolatları tanımlamak için genellikle floresan antikor (FA) testi yapılmasını gerektirir, bu da antiserumların ticari olarak bulunmadığı nispeten uzun ve emek gerektiren yoğun bir prosedürdür. Ek olarak M.

bovis'in akciğerlerden izolasyonu özellikle kronik olarak etkilenen hayvanlarda zor olabilir çünkü antibiyotik tedavisi, otoliz veya brüt bakteriyel kontaminasyon, izolasyonu inhibe edebilir. Süt dahil hayvan doku örneklerinden *M. Bovis*'i doğrudan tespit eden ve tanımlayan moleküler yöntemler, geleneksel izolasyon yaklaşımına göre muhtemelen daha iyi alternatiflerdir.

Gelişmiş bir PCR tekniği olan real-time PCR, yakın zamanda klinik mikrobiyolojiye dahil edilmiştir. Geleneksel PCR ile karşılaştırıldığında real-time PCR daha hızlıdır, numunelerin yüksek verimi için daha uygundur ve nükleik asit konsantrasyonunu ölçebilir. Bununla birlikte, ilave işçilik ve zaman, spesifik mikoplazma antikorları elde etme zorluğu ve nested PCR kontaminasyonu riski nedeniyle maliyet ve fayda göz önünde bulundurulmalıdır (Cai ve ark., 2005).

Real-time PCR testinin, *M. bovis*'in spesifik tespiti için ve enfeksiyon teşhisi için potansiyel bir araç olarak etkili olduğu belirlenmiştir. Test, TaqMan prob tabanlı testlerin bildirilen hassasiyeti ile iyi karşılaştırılmıştır ve bir teşhis ortamında kullanımının hızlı ve ucuz olduğu gösterilmiştir. Bu, gelişmiş testin hızlı ve ekonomik bir teşhis aracı olarak uygunluğuna işaret etmiştir (Behera ve ark., 2018).

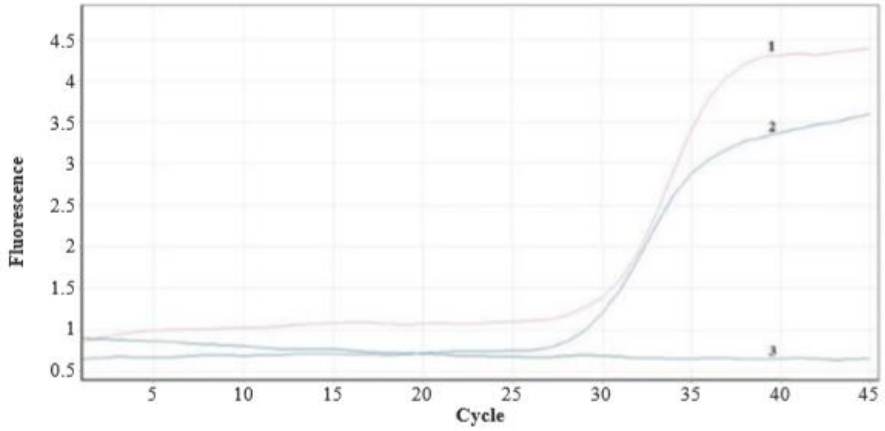
***Riemerella anatipestifer* Enfeksiyonları**

R. anatipestifer (RA), Flavobacteriaceae familyasındaki gram negatif bir bakteridir. RA, çeşitli kanatlı kuş türlerini enfekte edebilir ve özellikle ördek endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara neden olabilir. RA, yüksek mortalite, kilo kaybı ve karkas kontaminasyonu ile dünya çapında bir ördek hastalığıdır. Farklı ülkelerde en az 21 serotip tanımlanmıştır. Bunların 1, 2, 3, 5, 10 ve 15 serotipleri Çin'deki en büyük salgınlardan sorumludur. RA izolatlarını ayırt etmek için geleneksel yöntem, 16S rRNA veya *rpoB*genlerine dayanan PCR, tekrarlı-dizi polimeraz zincir reaksiyonu (Rep-PCR), multipleks PCR ve PCR-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) gibi yöntemler kuşlarda RA enfeksiyonunun saptanması için geliştirilmiştir. Bu yöntemler daha az hassas, fazla emek ve amplifikasyon ürünlerinin tespiti için agaroz jel analizi gerektirir ve kontaminasyon riski vardır. PCR, gerçek zamanlı olarak amplikonların tespiti için yüksek hassasiyet, özgüllük ve zamandan tasarruf sağlayan mükemmel bir teşhis aracıdır. RA enfeksiyonlarının teşhisi için serolojik test ve RA izolasyonu gibi geleneksel yöntemler mevcuttur. RA izolasyonu zaman alıcıdır ve serolojik testler farklı RA'lar arasında

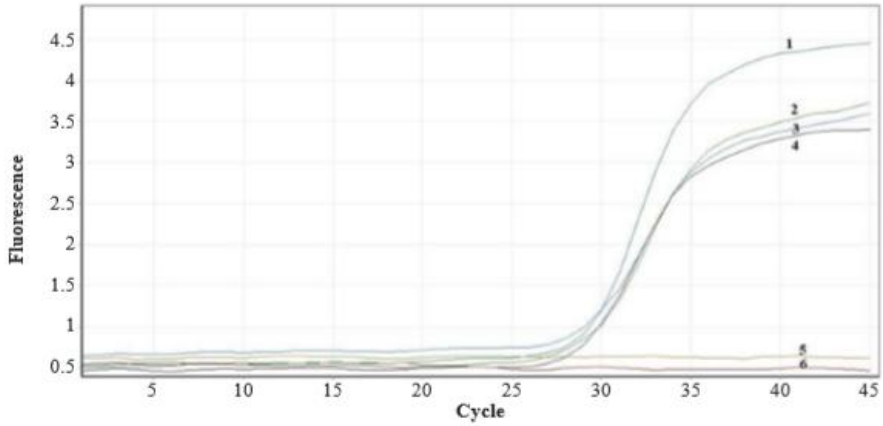
serolojik çapraz reaktiviteyi önlemek için spesifik antikorlar gerektirir. RA enfeksiyonunu hızlı bir şekilde teşhis etmek için, TaqMan tabanlı real-time PCR başarıyla kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2017).

***Brucella abortus* / *Brusella melitensis* Enfeksiyonları**

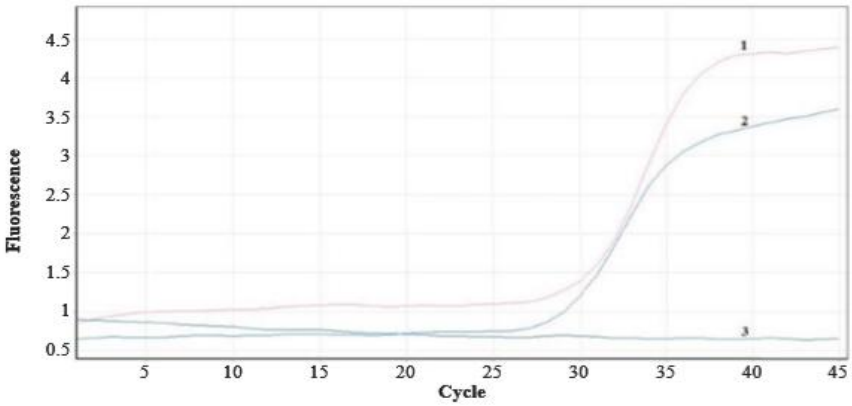
Devam eden eradikasyon programlarına rağmen, bruselloz esas olarak sığır, koyun, keçi ve domuzları enfekte eden yaygın bir zoonozdur. Sığır, koyun ve keçilerde abort ve infertilite nedeniyle hayvancılıkta önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bazı *Brucella* türleri de insanları enfekte edebilir ve dünya çapında yılda 500.000'den fazla insan vakası rapor edilmektedir. İnsanlara bulaşma farklı yollardan gerçekleşir: pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin kullanılması, enfekte hayvan dokularıyla doğrudan temas, yanlışlıkla *Brucella*'nın yutulması, solunması veya enjeksiyonu. *Brucella* altı klasik türden (*B. abortus, B. canis, B. melitensis, B. neotomae, B. ovis ve B. suis*) ve beş yeni türden (*B. ceti, B. microti, B. inopinata, B. papionis* ve *B. pinnipedialis*) oluşur. Gram-negatif, fakültatif hücre içi patojenlerdir. *Brucella* yavaş büyür ve 3-4 gün sonra kültürler görünür hale gelir ancak kesin bir sonuç elde etmek 2 haftadan fazla bir süre alır (Kaden ve ark., 2017).



Şekil 2. *Brucella* cinsinin real-time PCR amplifikasyon eğrileri 1. *Brucella spp.* pozitif kontrol; 2, 3 ve 4. Pozitif numune; 5. Negatif kontrol; 6. Negatif örnek



Şekil 3. *B. abortus* real-time PCR amplifikasyon eğrileri 1. *B. abortus* pozitif kontrol; 2. Pozitif numune; 3. Negatif kontrol



Şekil 4. *B. melitensis* RT-PCR amplifikasyon eğrileri 1. *B. melitensis* pozitif kontrol; 2. Pozitif numune; 3. Negatif kontrol

Real-time PCR, hızlı immünolojik yöntemlere kıyasla daha hassastır. Ayrıca, immünolojik yöntemler ile antijen-antikor etkileşimleri, spesifik olmayan etkileşimlerle zor olabilir ve yüksek seviyelerde dolaşım antikorlarına sahip aşılanmış hayvanlardan yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Serum örneklerinde real-time PCR'nin diğer yöntemlerden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Khamesipour ve ark., 2015).

Staphylococcus aureus Enfeksiyonları

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) Gram-pozitif, fakültatif anaerobik, sporsuz, hareketsiz, katalaz-pozitif ve oksidaz-negatif bir bakteridir. *S. aureus*, hem insanların hem de hayvanların derisinde, burnunda ve solunum yollarında kommensal mikrobiyotanın bir parçasını oluşturur. Mastitis, süt veriminde ve süt kalitesinde azalmaya neden olan, ciddi

ekonomik kayıplara yol açan, bulaşıcı hastalıklardan biridir. *S. aureus* süt sürülerinde mastitis ile ilişkili en önemli patojen olarak kabul edilmektedir (Awad ve ark., 2017).

S. aureus izolatlarında koagülaz geni (*coa*), metisilin direnç genini (*femA*), termonükleaz genini (*nuc*) ve 442 bp'lik bir kromozomal DNA insersiyonu (*Sa442*) için gerekli olan faktör de dahil olmak üzere çeşitli türe özgü belirteçler tanımlanmıştır. Hem *coa* hem de *femA* yüksek polimorfizm gösterir ve teşhis amaçları için uygun değildir. Aksine *nuc*, hem insan hem de hayvan izolatlarında türe özgü bir marker olarak sıklıkla kullanılır ve *S. aureus* suşları arasında yüksek oranda korunur. Bununla birlikte, bazı izolatlar *nuc* geninin kısmi silinmesi veya mutasyonu ile *nuc* negatif olarak rapor edilmiştir. Son zamanlarda, *Sa442* hedeflemesi, birkaç insan suşu arasında *Sa442*'de kısmi silme tanınmasına rağmen, kültür analizlerine alternatif bir yöntem olarak önerilmiştir. Sonuç olarak, bir genin tek bir markör olarak kullanılması yanlış tanımlamaya yol açarken, türe özgü bir başka markerin dahil edilmesi suş kapsamını ve test sağlamlığını artırabilir (Pilla ve ark., 2013).

Nuc veya *Sa442* genlerinin varlığını veya yokluğunu tespit etmek için tüm numuneler tek gen real-time PCR analizi ile amplifiye edilerek, Tablo 1.'de sunulan primer dizileri kullanılarak elde edilen amplifiye PCR ürününün özgüllüğü, erime eğrilerinin analizi ile değerlendirilmektedir.

Tablo 1. Tek genli real-time PCR ve dupleks analizinde kullanılan primer dizisi ve amplikon boyutu

Gen	Primer Sekansı (5′–3′)	Amplikon Büyüklüğü
nuc	fw GCGATTGATGGTGATACGGTT rv AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	270bp
Sa442	fw GTCGGGTACACGATATTCTTCACG rv CTCGTATGACCAGCTTCGGT	178bp
Sa442	fwAATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG rvCGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA	108bp

Eva Green boyası ile real-time PCR'ye uygulanan yüksek çözünürlüklü erime analizinin kullanılması, spesifik olmayan amplifikasyonların kolayca saptanmasına izin vermiştir. Sığır mastitisi etkeni, atipik *S. aureus* izolatlarının doğrudan süt örneklerinde tespiti amacıyla RT-PCR başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Pilla ve ark., 2013).

Salmonella Enfeksiyonları

Salmonella cinsindeki türler, dünya çapında kümes hayvanlarının başlıca bakteriyel patojenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Kümes hayvanları sağlığı ve gıda endüstrisi için etkenlerin hastalık yapmasının önlenmesi ancak hızlı ve güvenilir izleme ve tarama programları ile sağlanabilmektedir. Geleneksel yöntemlerle *Salmonella* türlerini tanımlamak için genellikle 5-11 gün gerektiği için, bakteriyolojik yöntemlerle saptanması zaman alıcıdır. Ayrıca, numunede ilk *Salmonella* sayısı düşük olduğunda, yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir. Bu nedenle, sürüde veya gıda endüstrisinde *Salmonella*'yı tespit etmek için uygun bir örnekleme planına sahip hızlı ve hassas bir yöntem gereklidir. (Eyigor ve Carli, 2003).

Real-time PCR ile *Salmonella* cins düzeyinde *invA* geni hedeflenerek saptanabilmektedir. SYBR Green I formatına sahip Light Cycler real-time PCR'ın, geleneksel PCR tespit yöntemlerinden yaklaşık 10 kat daha hızlı olduğu ve enfekte tavuk sürülerinin tanı süresini önemli ölçüde azaltabileceği ortaya konulmuştur.

Tablo 2. Bazı bakteriker için RT-PCR'da kullanılan hedef genler, primerler ve prop dizileri

Bakteri	Hedef Gen	Primer	Prob
M. bovis	*uvrC*	5′AAGTTGAAGTTGACCGGTTT3′ 5'TCTCCATATTTGGACCTAGTCTTT3'	SYBR Green I
R. anatipestifer	*DtxR*	5′CTGCTGTAACTGTAGATAC3' 5'GAAGGTGTGAGAAATACC3	5′(FAM)CGGTTACCATCATAGAAGCGTCA (Eclipse)-
B. abortus	*BruAb2_0168*	5'GCACACTCACCTTCCACAACAA/ CCCCGTTCTGCACCAGACT3'	FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ-1
B. melitensis	*BMEII0466*	5'TCGCATCGGCAGTTTCAA/ CCAGCTTTTGGCCTTTTCC3	Cy5-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ-2
S. aureus	*Nuc*	5'GCGATTGATGGTGATACGGTT/ AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC3'	EvaGreen
S. aureus	*Sa442*	5'GTCGGGTACACGATATTCTTCACG/ CTCGTATGACCAGCTTCGGT3'	EvaGreen

Salmonella	*invA*	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCG GGCAA-3' 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAAC C-3'	SYBR Green I

SONUÇ

PCR, hayvan ve insan hastalıklarının teşhisinde patojenik mikroorganizmaların saptanması, tanımlanması ve farklılaştırılması için yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir. Enfeksiyöz hayvan hastalılarının önüne geçebilmek ve potansiyellerini belirleyebilmek için hastalığa neden olan etkenlerin iyi tanımlanması gerekmektedir. Konvansiyonel teknikler genel anlamda kültür ve koloni bazlı, immünolojik bazlı ve PCR bazlı metotlardır. Kültür ve koloni bazlı metotlar mikrobiyolojik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılması ve az maliyetli olmasına rağmen zaman ve emek isteyen metotlardır. Bakterilerin her zaman aynı fenotipik özellikleri göstermemesi, kültürünün zor veya imkansız olması, görünür kolonilerin elde edilebilmesi için uzun zaman gerektirmesi, fenotipik özelliklere bakılarak tanımlama ve sınıflandırmada ortaya çıkan zorluklar gibi sınırlamalara sahiptir. İmmunolojik bazlı metotlar antijene spesifik antikor ya da antikora spesifik antijen aranması prensibine dayalı kalitatif ve kantitatif testleri içermektedir. Antikorların antijene olan ilgilerinin az olması, kontaminasyon riskinin fazla olması, düşük miktarlardaki patojenleri tespit edememesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. PCR bazlı metotlar DNA dayalı metotlar olup diğer metotlara göre hızlı, güvenilir, hassas, özgül ve tekrarlanabilir metotlarlardır. Bu teknik bakteriyel sınıflandırmada özellikle de fenotipik açıdan atipik bakteri suşlarının tanımlanmasında son derece güvenilirdir. Fakat PCR bazlı metotların, primerin kendi içinde eşleşmesi veya aralarında eşleşerek primer dimerlerini oluşturması yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmesi gibi dezavantajları da mevcuttur. Ayrıca PCR ürünleri görüntülemek için Et-Br kullanımı kontaminasyona neden olabilir. Fakat bunlarla beraber tüm bu konvansiyonel metotlar miktar ile ilgili tam anlamıyla bilgi vermemekte ve istenilen güvenilirliği sağlamamaktadır. Bu sınırlandırmaların önüne geçebilmek için amplifikasyonun eş zamanlı olarak izlenilebildiği real-time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan popüler bir metotdur. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile

konvensiyonel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı bir amplifikasyon yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda 'kinetik PCR', 'homojen PCR', 'kantitatif real-time PCR' olarak da isimlendirilmektedir. Real-time PCR'da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır. Amplifikasyonun devir sayısı ise belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından gereklidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green I metodu en basit ve özgül olmayan belirleme yöntemdir. SYBR GreenI yöntemi, reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışıma yapabilir. Özgül belirleme yöntemleri ise TaqManprob veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyonproblarını içeren yöntemlerdir. Real-time PCR'ın patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizinde kullanılmaktadır. Ticari olarak satılan birçok real-time cihazı vardır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar "eksitasyon" ve "emisyon" dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir.
Real-time PCR yönteminin gen ekspresyonunda daha hassas, verimli, hızlı ve daha üretken olması tercih edilmesinin sebebidir. Real-time PCR teknolojisi konvansiyonel metotlar ile kıyaslandığında kısa sürede sonuç vermesi, spesifitesi ve hassasiyeti ile güvenilir bir metottur. Sonuç olarak morbidite ve mortalitesi yüksek, etken izolasyonu zor ya da imkansız olan ve acil teşhis gerektiren durumlarda, enfeksiyonların yaygınlaşmadan kontrol altına alınabilmesi için PCR sistemleri günümüzde en önemli teşhis metodlarıdır. Real-time PCR teknolojisinin, kullanıcılar tarafında tercih edilen çeşitli alanlardaki önemi gittikçe artmaktadır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır

KAYNAKLAR

Ahrberg, C.D. & Neužil, P. (2015). Doubling through put of a real-time PCR. *Sci. Rep*., 5(12595), 1-9. https://doi.org/10.1038/srep12595

Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersal, L., Arya, N. & Patel, H.R.H. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Exper. Rev. Mol. Diagn.*, 5(2), 209-219. https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209

Awad, A., Ramadan, H., Nasr, S., Ateya, A., Atwa, S. (2017). Genetic characterization, antimicrobial resistance patterns and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* isolated form Bovine mastitis. *Pak. J. Biol. Sci*., 20(6), 298-305. https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.298.305

Behera, S., Rana, R., Gupta, P.K., Kumar, D., Rekha, V., Arun, T.R., Jena, D. (2018). Development of real-time PCR assay for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Trop. Anim. Health Prod*., 50(4), 875-882. https://doi.org/10.1007/s11250-018-1510-1

Cai, H.Y., Bell-Rogers, P.B., Parker, L., Prescott, J.F. (2005). Development of a real-time PCR for Detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *J. Vet. Diagn. Invest*., 17, 537-545. https://doi.org/10.1177/104063870501700603

Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., Smith, T.F. (2006). Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev*. 19(1), 165-256. https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006

Eyigor, A., Carli, K.T. (2003). Rapid detection of *Salmonella* from poultry by Real-Time Polymerase Chain Reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Diseaes*, 47(2), 380-386. https://doi.org/10.1637/0005-2086(2003)047[0380:RDOSFP]2.0.CO;2

Green, M.R., Sambrook, J. (2018). Analysis and normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) experimental data. *Cold Spring Harbor Protocols*, 10, 095000. https://doi.org/10.1101/pdb.top095000

Kaden, R., Ferrari, S., Alm, E., Wahab, T. (2017). A novel real-time PCR assay for specific detection of *Brucella melitensis*. *BMC Infectious Diseases*, 17(230), 1-6. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2327-7

Khamesipour, F., Doosti, A., Rahimi, E. (2015). Molecular study of Brusellosis in camels by the use of Taq Man Real-time PCR. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.,* 62(4), 409-421. https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.6

Kralik, P., Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front. Microbiol*., 8(108), 1-9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108

Mackay, J., Lant, O. (2007). Real-Time PCR Fluorescent Chemistries. Hilario E, Mackay J. (eds). Methods in Molecular Biology, Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Second Edition, Totowa, Humana Press, 353, 237-261. https://doi.org/10.1385/1-59745-229-7:237

Matsuda, K. (2017). PCR-Based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: Real-Time PCR and its substantial contribution toward technological refinement. *Advances in ClinicalChemistry*, 80, 1-28. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002

Pilla, R., Snel, G.G.M., Malvisi, M., Piccinini, R. (2013). Duplex real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. *Journal of Dair Research*, 80, 223-226. https://doi.org/10.1017/S0022029913000022

Valones, M.A.A., Guimarães, R.L., Brandão, L.A.C, de Souza, P.R.E., Carvalho, A.A.T., Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A revıew. *Br. J. Microbiol*., 40, 1-11. https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001

Zhang, Q., Wan, C., Li, C., Bai, X., Liu, M., Liu, S., Zang, S.Y.(2017). Evaluation of a quantitative real-time PCR for rapid detection of *Riemerella anatipestifer* infection in birds. *J. Vet. Med. Sci*.,