

Hayvan İnfeksiyonlarının Tanısında LightCycler PCR Kullanımı

K. Tayfun ÇARLI.¹

Geliş Tarihi: 22.04.2009

Kabul Tarihi: 29.04.2009

Özet: LightCycler (LC) teknolojisi hızlı PCR gerçekleştirme işini PCR ürününün gerçek zamanlı gözlenmesiyle birlikte yapar. PCR sonrası hemen ürünün özgünlüğü erime eğrisi analizi ile belirlenebilir. LC sisteminin kapiller sistem oluşunun geleneksel PCR'a göre bazı avantajları vardır. Problemlerin ve ampliconların erime eğrisi analizi jel elektroforezi, southern blotting, hibridizasyon veya dizileme gibi sonradan yapılan uygulamalara gerek kalmadan ampliconun özgünlüğü ve etkenin genotiplemesine olanak verir. Amplifikasyon sürecinde PCR ürünü artışının izlenmesi ve TaqMan probu gibi bazı prob dizaynlarının kullanımıyla kapiller içinde kantitatif bir PCR 15 ile 45 dk arasında biter. Günümüzde veteriner hekimliğinde infeksiyöz hastalıklar bu teknoloji ile teşhis edilebilmekte ve klinik örnekler içindeki virus veya bakterilerin miktarları uygun gerçek-zamanlı PCR kimyasal prob dizaynı yaklaşımı ile tayin edilebilmektedir. Bu derlemede LC sisteminin bazı önemli özellikleri tanımlanmakta ve bu sistemin bazı hayvan hastalıklarında kullanımı hakkında bilgi verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: LightCycler PCR, hayvan, Gerçek-Zamanlı PCR.

LightCycler PCR in the Diagnosis of Animal Infections.

Abstract: LightCycler (LC) technology combines rapid cycle-PCR with real-time fluorescent monitoring and melting curve analysis. Capillary PCR ability of LC system has several advantages over the conventional PCR. Melting curve analysis of probes and amplicons provides genotyping and specificity of the amplicon without further applications such as gel electrophoresis, southern blotting, hybridization and sequencing. By monitoring product accumulation and the use of some probe design such as TaqMan probes during rapid amplification, quantitative PCR in capillary system is possible in 15 to 40 minutes. Infectious diseases in veterinary medicine can now be diagnosed by this technology and quantitative detection of viruses and bacteria from the clinical samples by an appropriate Real-Time PCR chemistry approach is currently possible. This review describes some important characteristics of the LC PCR systems and gives some information on the use of this system in some animal infections.

Key Words: LightCycler PCR, animal, Real-Time PCR.

¹ Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü, 16059 Bursa.
e-mail:tayfun@uludag.edu.tr

1. Giriş

Günümüzde hayvanların infeksiyöz hastalıklarının teşhisi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı tekniklerin uygulamaya sokulmasıyla olağan üstü bir modifikasyona uğramış ve hız kazanmıştır. Bazı hastalıkların tanısı bakteri, virus, mantar veya parazitin izolasyonunu ve identifikasyonunu gerektirirken, özellikle oldukça uzun ve zahmetli bir dizi laboratuvar işleminin yapılmasını kapsayan bazı durumlardaki uygulamalara PCR'in devreye girmesiyle gerek kalmamıştır. Örneğin, *Salmonella*'nın genus-spesifik veya serotip-spesifik varlığı gıda ve dışkı örneklerinde 2 gün içinde belirlenebilmekte^{8,22,32}, identifikasyonu günler alan *Mycoplasma*^{14,24,40} ve benzeri bakteri türlerinin^{9,26,45} tanımlanması aynı gün içinde gerçekleşebilmekte ve bir çok viral hastalık da⁴¹ çoğu kez aynı gün içinde teşhis edilebilmektedir.

1997'de "Boehringer Mannheim" firmasının Biyokimya bölümü "Idaho Technology" ile bir lisans işbirliği vasıtasıyla yeni bir teknoloji olarak LightCycler'ı (LC) geliştirmiştir. LC Polymerase Chain Reaction (LCPCR) sistemleriTM "Roche Applied Research" tarafından pazarlanan Gerçek-Zamanlı PCR (Real-Time PCR) makineleridir. Bu makineler PCR işlemini kendilerine özgü bazı özellikleri kapsamında gerçekleştirirler. Güncel olan 3 LCPCR sistemi bulunmaktadır. Bunlar, 1. LCPCR 1.5, 2. LCPCR 2.0 ve 3. LCPCR 480 sistemleridir. Bu LC sistemleri arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıkları Tablo 1'de görmek mümkündür.

Tablo 1. "LightCycler" sistemlerinin farkları (9 nolu kaynaktan değiştirilmiştir)

Table 1. Differences in the "LightCycler" Systems (modified from number 9 of references)

Özellik	LC 1.5	LC 2.0	LC 480
PCR gerçekleşme ünitesi	Kapiller	Kapiller	Mikrotitre pleyt
Bir Defada yapılabilen PCR sayısı	32	32	96-384
PCR hacmi (µl)	5-20	5-100	5-50
Işık Eksitasyon Kanal Sayısı	1	1	5
Işık Saçma (Emission) Kanal Sayısı	3	6	6
30 PCR döngüsü için Gerekli Süre (dak)	10-30	10-60	40-90

Sizlere bu yazımda laboratuvarımızda sahip olduğumuz LCPCR 2.0 sistemi ile ilgili bilgileri daha ağırlıklı olarak vereceğim. Bu nedenle sürekli iç içe olduğumuz ve *Salmonella*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis*, Marek's Disease Virus (MDV), Newcastle Disease Virus (NDV) taramalarını da içeren araştırmalarımızda kullandığımız LCPCR 2.0 için bilgi veren bu yazı aslında benim için belki de en zevkli, kolay ve bir solukta yazılmış bir derleme niteliğindedir.

2. LCPCR 2.0 Sisteminin Özellikleri

LC (Roche, Indianapolis, IN) ve ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) Real-Time PCR için kullanılan ilk iki PCR platformudur. İlk zamanlar bu iki platform arasındaki en göze çarpıcı fark ABI 7700'in örnek kapasitesinin fazla, LC'in ise hızlı olmasıydı. Hala kısa sürede sonuç alma açısından LC'in diğer platforma göre avantajları bulunmaktadır. Ancak tabii ki doksanlı senelerden beri bu iki sistem arasında etkileşimler olmuş her iki teknoloji kendinde bulunmayan bazı özellikleri bir diğerine aktararak melezlemeler gelişmiştir. Çarpıcı bir biçimde bu iki platformu birbirinden ayırmak için şu benzetmeyi hatırlatmak yararlı olacaktır. Araba endüstrisi ile analogi yapılacak olursa, LC bir spor araba, 7700 ise bir otobüstür. Otobüs daha çok insan taşır, ama spor araba daha az insanla hızlı hareket eder⁹.

LCPCR 2.0 sisteminin en önemli özelliklerinden biri hava ısıtma prensibi ile çalışmasıdır. Makine içindeki hava ısıtılarak bir fan aracılığı ile makine içi ortama homojen ve hızlı bir biçimde dağıtılır. Diğer konvansiyonel PCR makineleri su ısıtma işlemi ile çalışırlar. LCPCR 1.5 ve 2.0 makineleri diğer PCR sistemlerinden farklı olarak PCR tüpleri yerine özel kapiller borosilikat borucuklarla çalışır. Diğer bir deyişle PCR reaksiyonu şeffaf borosilikat borucuklar içinde gerçekleşir. Borosilikat cam borucuklar ve hava ısıtma sistemi aslında ilk olarak Idaho Technologies tarafından geliştirilmiş⁴⁹, daha sonra Roche LCPCR /Real-Time PCR sistemlerine uyarlanmıştır. Borosilikat borucuklar ve havanın ısıtılması ile gerçekleştirilen bu sistem içindeki reaksiyonda, konvansiyonel PCR'a göre bazı avantajlar bulunur. Öncelikle hava suya göre çok daha hızlı ısınıp soğuduğu için PCR zamanı minimuma iner. Bu sistemlerde PCR zaman süreci ortalama 30-45 dakika sürer. Bilindiği gibi, konvansiyonel su ısıtmalı "thermalcycler" makinelerinde PCR süresi 2-4

saat almaktadır. Buna ek olarak, hava düşük bir termal kapasiteye sahip olduğu için, havanın hızlı ısınıp soğuması ile PCR reaksiyon basamakları arasındaki sıcaklık değişimleri de 20 °C/sn gibi ani ve hızlı şekillenmektedir. Bir PCR amplifikasyon basamağı [denatürasyon, primerlerin hedefe yapışması (annealing) ve uzama (ekstansiyon)] yaklaşık 30-60 sn sürer. Böylece PCR süresi 10 kat kadar kısaltılmış olur. Hızlı sıcaklık değişimleri aynı zamanda primerlerin hedef dışındaki DNA dizilerine veya birbirlerine (Primer-dimer) bağlanma olasılığını azaltarak yanlış amplifikasyonları en aza indirmiş olmaktadır. Tüm bunların yanında borosilikat cam borucukların silindirik yapısı dolayısıyla yüzey arttırılmış olur ve böylece sıcaklık reaksiyona daha çok etkir^{50,51}.

Borosilikat cam tüplerin kullanımının bir başka avantajı PCR reaksiyon hacminin konvansiyonel PCR'a göre yaklaşık yarı yarıya azalmasıdır. LCPCR 2.0'da kullanılan reaksiyon hacmi genellikle 25 µl, konvansiyonel PCR'da 50 µl dir. Bu nedenle kullanılan, reagent miktarları (primer, probe ve enzim), özellikle Taq polimeraz enzimi miktarı, azaldığı için test maliyeti dramatik bir biçimde düşer. Bu da laboratuvar için ve dolayısıyla testi talep eden hasta sahibi veya veteriner için ekonomiklik demektir⁵².

Bunlar dışında cam kapillerler, cam fiber optiklere benzer biçimde, ışığı çekerek ve sinyali kapillerin ucunda yoğunlaştırarak sinyal toplamaya hizmet eder. Bu etki kapiller içindeki mikro hacimdeki sıvıda flüoresan izlemeye ve görüntülemeye yarar. PCR içeriğini içinde bulunduran bu şeffaf kapiller borucuklardan aletin içine 32 adet yerleştirilebilir. LCPCR aletinin bir diğer özelliği optik sisteminin oluşudur. Bu sistemle kapiller içinde olan PCR görsel olarak izlenebilir. Bundan dolayı LC "Rodenstock" adlı kaliteli bir üreticinin yüksek kalitede optik sistemlerini kullanan bir mikrovolum florimetre (flüoresan ölçer) ile kombine edilir. PCR sürecinde kapillerlerden toplanan değişik dalga boyundaki flüoresan sinyalleri bu "Rodenstock" optik sistemden geçerek foto-hibridler tarafından toplanır. LC bu flüoresan sinyallerini analiz eden bir yazılımı bulunduran bir bilgisayarla bağlantılı durumdadır ve sinyallerin hepsi bu yazılım ile analiz edilerek sonuçlar toplanır^{5,53}.

LC daha önce de söylendiği gibi bir bilgisayarla bağlantılıdır ve bu yazılımın programının kullanımı son derece kolaydır. Bu nedenle PCR sürecindeki ve sonrasındaki analizler kolay ve gerçekçi bir şekilde gerçekleştirilir. PCR sürecinde reaksiyonlar, on-line olarak flüoresan ölç-

çümleri için florimetre optiklerinin üzerindeki örnekler, yüksek-hassasiyetli basamak hareketi yapan bir döner hareket sağlayan motorik hareketle izlenir. Bilgisayar yazılımı her flüoresan ölçümünü hemen gerçek zamanlı bir biçimde analiz eder. Örneklerden gelen flüoresan sinyaller optik ünite üzerinden makinenin pozisyonlandığı sıra ile elde edilir. Flüoresan okuma zamanı 10-100 milisaniye kadar kısadır. Her döngü sonunda döngü sayısına karşı miktarsal (kantitatif) flüoresan görüntüsü oluşur ve monitöre yansıtılır. Bu görüntü tüm örnekler için alınır. Oluşturulan veriler sonraki analizler için saklanır ve arzu edildiğinde "melting curve" gibi ileri analizler eklenir^{39,52}.

LC'ın parçası olan florimetre bir ışık kaynağı barındırır. Dışarı verilen ışık filtre edilir ve kapillerin ucu üzerine bir üst-görüntüleme merceği ile odaklanır. Örnekten saçılan flüoresan ışık aynı lensler tarafından odaklanır, bir aynadan geçer, uygun bir biçimde filtrelendir ve tekrar veri-toplayıcı fotohibridlere odaklanır. Bu optik ünite aynı zamanda üç renk deteksiyonu olanağı veren üç bant filtre içerir (530 nm, 640 nm ve 710 nm).

PCR sürecinde amplifikasyon ürününü belirlemek amacıyla ilk zamanlar temel olarak iki farklı yaklaşım söz konusu olmuştur. Bunlar "SybrGreen I" boyası formatı ve "Hibridizasyon Probe-FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)" formatıdır.

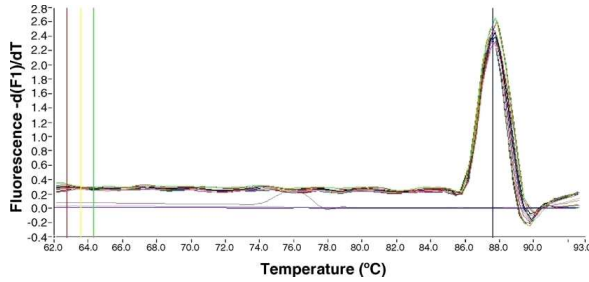
SybrGreen I formatında amplifikasyon sürecinde artan çift iplikçikli DNA (ds DNA) bu boya ile birleşir. Etidyum bromid gibi SybrGreen I boyası ds DNA ile bağ kurar ve boyanın flüoresan ışınması bağlanmayla birlikte anormal bir şekilde artar. PCR içindeki bu boya her yeni sentezlenen DNA derişimi ile orantısal bir biçimde artarak flüoresan ışınması verir. Eğer amplifikasyon sürecinde yeni DNA sentezlenmemişse flüoresan artışı da olmayacak ya da gözlenmeyecektir.

SybrGreen I'den kaynaklanan bu flüoresan sinyal artışı her PCR döngüsünde veya gerekli ise devamlı bir şekilde ölçülebilir. Tabii ölçüm mü yapılacağı veya ölçümün sürekli mi alınacağı önceden parametre olarak programlara girilmelidir. Reaksiyon sürecinde alınan bu SybrGreen I'e bağlı flüoresan artışları gerçek zamanlı bir şekilde bilgisayar monitörüne yansıtılır ve izlenir. SybrGreen I bağlantılı flüoresan artışının arzu edilen spesifik DNA'ya nedeniyle olup olmadığı ise, amplifikasyon süreci sonrası uygulanan "melting curve" analizi ile yapılır ve üretilen DNA'ların Tm (Temperature of Melting- PCR

ürünü erime sıcaklığı) dereceleri tespit edilir. Her DNA ürününün uzunluğuna ve içerdiği nükleotid baz türüne, özellikle “Guanine-Cytosine” içeriğine göre, özgün bir Tm’i vardır. Tm analizi sonrası belirlenen sıcaklık ürünün beklenen sıcaklığı ise ürün tam bir biçimde tanımlanmış olur (Grafik 1). Diğer taraftan Tm analizinde, primer-dimer birleşikleri eğer mevcutsa, daha düşük sıcaklıklarda Tm veren ve genişçe PCR ürün pikleri olarak ortaya çıkar.

Konvansiyonel PCR’da PCR ürününün spesifikliği genellikle elektroforez jelinde gözlenen DNA bantlarının nitroselüloz kâğıtlara transferi (southern transfer), buraya DNA’nın fiksasyonu, uygun problemlerle hibridizasyonu (southern hybridization), daha sonra radyografik veya nonradyografik yöntemlerle görüntülenmesi ile ortaya konulur. Ya da PCR ürününe dizileme (sequencing) uygulanır.

Yöntem ne olursa olsun, “sequencing” dışında, PCR ürünü spesifikitesi genellikle bir veya daha fazla özgün probun kullanımıyla yapılmaktadır. LC 2.0 sisteminde de amplifiye edilen DNA’nın daha spesifik olarak aranması isteniyorsa, birbirlerine bitişik yerleşen “hibridizasyon prob”ları kullanılmıştır. Böylece reaksiyon sürecinde oluşan ürünlerin özgünlükleri izlenir.



Grafik 1.

LightCycler’da Avian Reovirus S1133 suşunun PCR ürününün “erime eğrisi (melting curve)” analizi (18).

Graphic 1.

Melting Curve Analysis of PCR products of Avian Reovirus S1133 strain in the LightCycler 2.0.

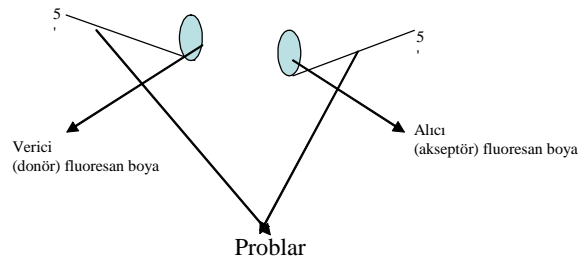
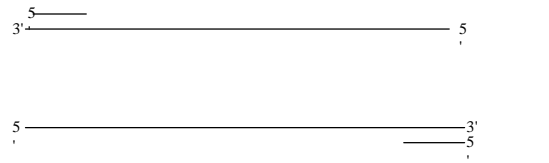
3. LC Sistemlerinde En Çok Kullanılan Problemler

Real-Time PCR sistemlerinde değişik amaçlarla kullanılmış olan bir çok tip probe dizayn edilmiş olmasına karşın, veteriner infeksiyöz hastalıkları ile ilgili olarak SyberGreen I kimyası dışında sıklıkla rapor edilen iki prob

FRET (Hibridizasyon)^{3,55} ve TaqMan (hidrolizis) (7, 23) problemleridir.

3.1. FRET Problemleri.

FRET (Floresan Enerji Transfer) problemleri LC sisteminde ilk kullanılan prob yaklaşımıdır. Bu problemler amplifikasyon primerlerinin iç tarafına göre dizayn edilirler. İki adet probdan birinin 3’ ucu verici (donor) bir floresanla (genellikle fluorescein) diğer bitişik probun ise 5’ ucu ise bir alıcı (akseptör) boya ile işaretlenir (Şekil 1a). Bu boyalar arasında Floresan Enerji Transferi sadece iki prob PCR ürününe çok yakın konumda hibridize olduklarında şekillenir. FRET süreci boyunca, bir donor fluorofor boya bir dış ışık kaynağı tarafından uyarılır ve yoğunlaşan ışık ikinci bir alıcı fluorofor boya tarafından absorbe edilir. Tekrar söylemek gerekirse bu sadece iki probun birbirine çok yakın olarak yerleştiği durumlarda şekillenir (Şekil 1b). Akseptör boya absorbe ettiği ışığı değişik bir dalga boyundan yayar ve bu ışık filtrelenerek ölçülür. FRET sinyalinin düzeyi hibridizasyona katılan spesifik DNA ürününün miktarı ile orantılıdır; bundan dolayı her siklus sonrası sinyal artar. LC’da geliştirilen bu ilk prob yaklaşımı “hibridizasyon prob formatı” olarak anılmaktadır. Bu yaklaşımla laboratuvarımızda 2003 yılında kendimizin orijinal olarak dizayn ettiği problemlerle *Salmonella* genusu spesifik PCR’ı LightCycler 2.0 sisteminde başarı ile kullandık¹¹.



Şekil 1a.

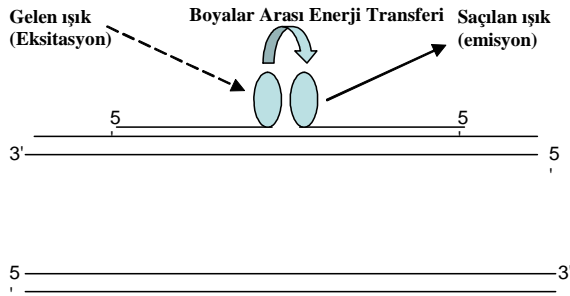
Primerler templeyitten yeni DNA segmentini sentezler. Problemler ayrı durumdadır.

Figure 1a.

A new DNA segment is synthesized by the primers. Probes are away from the target (DNA).

3.2. TaqMan Probları.

Aslında bu proplar Applied Biosystems tarafından ilk kez ABI 7700 Real-Time PCR makineleri ile birlikte piyasaya sunulmuştur. Daha sonra LC makinelerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Şu anda Marek's Disease Virus'unun aşı suşunun mutlak kantitasyonlarını bu yöntemle çalışmaktayız. Hidrolizis veya TaqMan problemlerinde prob ters uçlarından bir flüoresans "reporter" bir de "quencher" ile işaretlenir (Şekil 2a). PCR sürecinde hedefe yapışık olan problemler Taq polimeraz enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile hidrolize edilir (Şekil 2b), "reporter" ucundan flüorofor ayrılır ve flüoresan miktarı artar (Şekil 2c). Buradaki flüoresan artışı prob hidrolizinin bir sonucu olduğu için (prob birleşmesi değil), bu problemlere hidrolizis problemleri denir. Birden fazla prob kullanımı ve her proba farklı bir flüorofor etiketlenmesi ile multipleks (çoklu) deteksiyon yapmak olanaklıdır. Örneğin, biz laboratuvarımızda TaqMan Hidrolizis prob yaklaşımı ile, Marek Hastalığı Virüsü "Rispen's" suşu için daha önce ABI 7700 makinesi için geliştirilmiş olan absolute virus kantitasyon çalışmalarını¹, LC'ya adapte ederek test amplifikasyonu için *meq* genini ve kontrol amacıyla *ovo* genini aramak için iki prob kullanmaktayız ve duplex Real-Time PCR'ı uygulamaktayız.

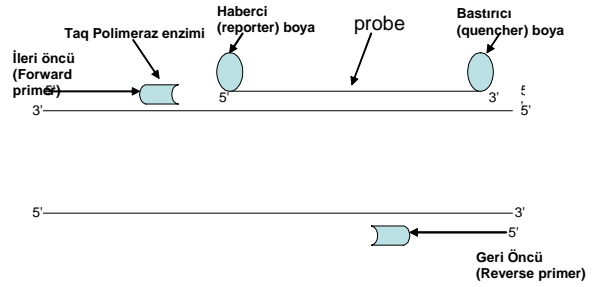


Şekil 1b.

Problar birbirine uygun yakınlıkta bağlanır ve gelen ışığı alan ilk prob aktive olan enerji diğer proba aktarılır. İkinci probdan saçılan flüoresan ışığa LC yazılımı tarafından analize edilir.

Figure 1b.

Probes hybridize the DNA segment in an appropriate distance to each other and the first dye in the first probe is excited by a light and transfer the energy to second dye in the second probe. Light emitted from 2nd dye are analysed by the software in the LightCycler.

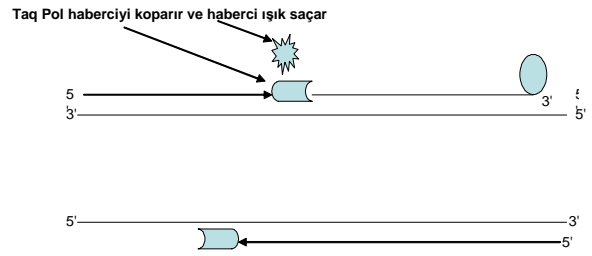


Şekil 2a.

TaqMan Probuunun yerleşimi

Figure 2a.

Localization of a TaqMan Probe.

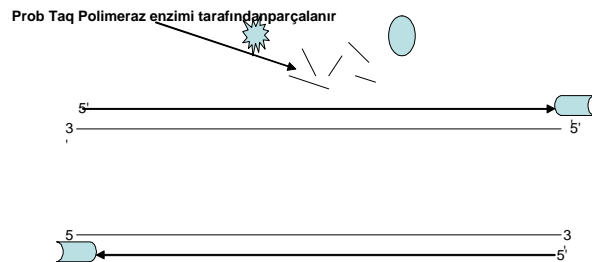


Şekil 2b.

TaqMan probunun Taq polimeraz enzimi ile kopuşu ve ışık emisyonu.

Figure 2b.

Cleavage of TaqMan Probe by Taq polymerase activity and light emission.



Şekil 2c.

Taq polimeraz enzimi yardımıyla probun tümüyle yıkımı ve primerin tümüyle uzamasıyla komplementer DNA oluşumu.

Figure 2c.

Total destruction of the probe by Taq polymerase enzyme and formation of complementary DNA by the extension of primers.

4. LC PCR'in Kullanıldığı Bazı Hayvan Hastalıkları

4.1. *Salmonella* İnfeksiyonları

Hayvanlarda oluşturdukları infeksiyonların yanı sıra insanlarda sorumlu oldukları, başta gıda kökenli infeksiyonları olmak üzere, birçok hastalık durumu nedeniyle önemli zoonotik serotiplere sahip olan *Salmonella enterica*'ya yönelik halk duyarlılığı Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği Ülkeleri'nde haklı bir biçimde çok üst düzeye ulaşmıştır. Bunun bir sonucu olarak hayvanlarda bu infeksiyonların en aza indirgenmesinin insan infeksiyonlarını en aza indireceği temeli üstüne *Salmonella* infekte hayvanların saptanması veya yetiştirmeden çıkarılmaları önlemi getirilmiştir. *Salmonella* bakterileri genellikle dışkıda ve kesimhanelerde dışkı bulaşmasını takiben kros kontaminasyonlar sonucu gıdalarda ve çevresel örneklerde bulunur. Bu matrikslerde aranmaları ise insan ve hayvan sağlığı için kaçınılmazdır. Bu bağlamda bakteriyoloji kullanılarak *Salmonella*'yı ortaya koymanın yanı sıra bu işin kısa bir süre içinde yapılması çok önemli hale gelmiştir. En kısa ve aynı zamanda güvenilir olarak Real-Time PCR sistemlerinden faydalanılmıştır. Bizim de bu konuda literatüre giren önemli çalışmalarımız olmuştur. Genellikle bir Real-Time PCR platformu olan LC'nin önemli diagnostik avantajlarından faydalandığımız çalışmalarımızda, öncelikle SybrGreen I-tabanlı geliştirdiğimiz metoda *Salmonella invA* geninin aranmasını hedefledik¹⁰. Bu geliştirdiğimiz yöntemde DNA templeyti hazırlamada *Salmonella* primer zenginleştirme besi yerlerinden faydalanarak en uygun olanının hayvan dışkıları için tetrathionate broth olduğunu saptadık. Primer zenginleştirmelerden LC PCR arama limitinin yaklaşık 1 hücreye dek düştüğünü ve çok yüksek sensitivitede olduğunu saptadık. Sonraki yıllarda FRET prob teknolojisi ile daha spesifik hale getirmeyi başardığımız LC PCR yöntemi¹¹ ile SybrGreen I yöntemimizi¹⁰ karşılaştırmalı çalıştık¹² ve aralarında çok önemli bir fark olmadığını gördük. Hayvan dışkılarında taramalarımıza daha az maliyetli olan SybrGreen I-tabanlı LC PCR ile sürdürdük. Bu güne dek gıda matriksleri üzerine Roche'un ürettiği hazır prob spesifik ticari kitler dahil olmak üzere geliştirdiğimiz LC PCR yöntemlerini kullanarak gerek gıda örneklerinde ve gerekse dışkılarda bakteriyolojik yöntem ile koşut olarak sürdürülen *Salmonella* taramaları ile dünyada en güvenilir ve hızlı yöntemlerden bazılarını uyguluyoruz yorumunu yapabilirim.

Laboratuarlarda, *Salmonella* taramalarının LC PCR sistemleri ile bakteriyolojiye paralel olarak yürütülmesi ile *Salmonella* kontamine gıdalar ve infekte hayvan sürüleri hızlı bir biçimde teşhis edilerek, önemli ekonomik kayıpların önlenmiş olmasının yanında, ve daha önemlisi, halk sağlığı açısından kritik bir işlem yapılmış olacağı görüşündeyim.

4.2. *Mycoplasma* İnfeksiyonları. Bu güne dek hayvanlarda *Mycoplasma* türlerinin identifikasyonuna yönelik uygulanan LC PCR yöntemlerinin sayısı kısıtlıdır. LC PCR kullanımını içeren çalışmalar, kanatlılarda *M.gallisepticum*, *M.synoviae*, *M.meleagridis* ve *M.iowae* üzerinedir^{6,37}. Bu çalışmaların bazılarında bu dört avian patojenik *Mycoplasma* türünün LC'da taranması yapılırken, diğer bazı çalışmalarda LC sisteminden *M. gallisepticum*'un alttip ayrımının (ts-11, 6/85, F strain ve wild-type suşlar) olanaklı hale getirildiğini gözlemekteyiz³⁶. Alt tip ayrımı kanatlılarda aşı kullanılan sürülerde aşı ve saha suşu ayrımının yapılmasına olanak sağlamakta ve laboratuvar alt yapısı eksikliğini giderme açısından büyük önem taşımaktadır. Tabii bu yöntemle her zaman sadece tek başına alt tip ayrımının yapmanın bazı sakıncaları olabilmektedir. Örneğin, yeni varyant *M. gallisepticum* suşlarının yakalanmaması en önemli sorun olabilir. Bu durumda PCR-tabanlı testleri uygulayan laboratuvarların mutlaka *Mycoplasma* izolasyon ve diğer genotiplendirme alt yapılarının olması gerekliliği kaçınılmazdır. Konuya geri dönecek olursak, avian patojenik *Mycoplasma*'ları saptayan geniş anlamda Real-Time prensipli PCR metodları olmasına rağmen, LC-tabanlı yöntemler toplam 3 adettir. Bunlardan ilki 2003 yılında yayımlanmış ve laboratuvarımızda geliştirilmiş bir yöntemdir⁶. Bu yöntemde SybrGreen I-tabanlı bir Real-Time PCR uygulanmış ve *M.gallisepticum* tavuk trachea'larından kalitatif olarak DNA ekstraksiyonu hariç 40 dk içinde belirlenebilmiştir. Bu çalışmamızda deteksiyonla ilgili yaşanan bazı problemler, tracheal örneklerin hazırlanması nedeniyle yaşanmış olsa da, şu anda laboratuvarımızda bu sorunların üstesinden yeni bir araştırma projesinin bitirilmesi ile gelinmiştir. Bu proje sonuçları da yakında yayına gönderilmek üzere hazırlanmaktadır (Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Proje No: 2006/29). Literatürde *M.gallisepticum*'un LC PCR uygulamasıyla tavuktan deteksiyonu ile ilgili ilk makale budur. Daha sonra 2009 yılında, Raviv ve Kleven³⁷ LC 2.0 sistem için *M.gallisepticum* dahil dört avian patojenik *Mycoplasma* türünü de saptayabilen

diagnostik TaqMan prob'u ile çalışan bir Real-Time PCR geliştirmişlerdir. Bu çalışmanın prob spesifik oluşu ile daha spesifik ve hedeflenen amplikon büyüklükleri nedeniyle LC'ya daha özgün olduğu düşünülebilir. Bu çalışmanın saha denemelerini yaptıktan sonra, laboratuvarımızda kullanımını ön görmekteyiz. Yine aynı araştırmacıların sorumlu olduğu bir başka araştırmada ise bu kez, LC PCR teknolojisi için *M.gallisepticum* suşlarının tiplendirilmesi yapılmıştır. Standart F, ts-11, 6/85, K5831, K5054 ve R_{low} *M.gallisepticum* suşları birbirinden ayırt edilebildiği bu çalışma ile bir ölçüde aşı suşları olan F strain, ts-11, 6/85 ile hastalık suşlarının ayırımı yapılabilmektedir³⁶. Bu çalışmanın pratikteki faydası kısa bir süre içinde özgün bir biçimde, aşı sürülerde aşı viruslarının kalıcılığının izlenmesi ve yine aşılanmış sürülerde saha *M.gallisepticum* suşunun varlığının belirlenmesi ya da ayırımının yapılabilmesidir.

4.3. Marek Disease Virusü Aşı Kantitasyonu. Marek Hastalığı Virusü tavukların onkojenik bir herpesvirusudur. Lenfoid hücreler ve epitelium hücrelerinde replike olur. T hücrelerinde latent formda replike olmadan kalır. Virus tüm organ, doku ve tüy foliküllerine kandaki lenfositlerle yayılır. Özellikle yumurta tavukları için çok önem taşıyan bu viral hastalıkta, tüy folikülleri virusun tam prodüktif ve infeksiyöz formunu taşır. Tüy foliküllerinden olgun virus partiküllerinin aranması ve izolasyonu olanaklıdır. Ayrıca aşı virusu da aynı saha virusu gibi davranarak, epitel hücrelerinde bulunur. Özellikle aşılama sonrası 21. günde buradaki varlığı maksimum düzeyeye ulaşır. Baigent ve ark.¹ 2005 yılında İngiltere'de Rispsens Suşu ile aşılanmış tavuklarda aşı titrelerini ölçmek için Real-Time kantitatif bir PCR geliştirerek, aşı virusunun aşılama sonrası tüy foliküllerinde absöüt sayılarını saptamışlardır. Geliştirdikleri TaqMan prob PCR yönteminde hem *ovo* hem de *meq* geni (onkojeniteden sorumlu gen) dubleks bir Real-Time PCR ile miktar ölçümleri yapılmaktadır. Bu yöntem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection Sistemi (Applied Biosystems)'ne oturtulmuştur. Biz de benzer bir yöntemi (TaqMan Prob sistemini) kapiller cam borucukların kullanımı ile çalışan LC 2.0 sistemine adapte ettik ve şu anda aşı ve infekte tavukların tüy folikül epitellerinde genom kopya sayısı üzerinden sırasıyla aşı virusunun ve saha virusunun sayılarını belirleyebilmekteyiz. Bu yapılan işlem sonucunda aşılanmış hayvanlarda bağışıklığın oluşup oluşmadığı, aynı hayvanlarda saha virusunun bulunup bulunmadığı belirlenebilmek-

tedir. Tabii ki saha virusunun belirlenebilmesi için ayrı bir teste gereksinim bulunmaktadır. Bu test Murata ve ark.²⁹ tarafından geliştirilen "nested" konvansiyonel bir PCR testinin, LC kapiller sistemine "nested" olmaksızın uyarlanmasıyla laboratuvarımızda optimize edilmiş durumdadır.

4.4. Diğer İnfeksiyonlar. LC PCR sistemi kullanımıyla yukarıda yapılan uygulamalar dışında, veteriner sahada birçok bakteri ve virusun aranması amacıyla uygulamaya sokulmuştur. Örneğin, *Bacillus anthracis* hızlı bir şekilde SybrGreen I yöntemiyle saptanmıştır²¹. Yine *Borrelia burgdorferi*'nin kenelerde kantitatif varlığını gösteren bir çalışma yapılmıştır⁴⁷. Ayrıca, *Leptospira*^{13,54}, *Chlamydomphila psittaci*¹⁵, *Campylobacter*³⁸, *Mycoplasma suis*¹⁶, *Mycobacterium bovis*^{4,44}, *Taylorella equigenitalis*³⁴ ve *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*^{32,42} LC PCR sistemleri ile deteksiyonu yapılan diğer bakteriler arasındadır. Viral hastalık etkenlerinden ise Infectious Salmon Anemia (ISA) Virus²⁸, Porcine Teschovirus ve Enterovirus²⁰, Porcine Parvovirus³⁵, Parapoxvirus³⁰, Küçük Ruminant Lentiviral nükleik acidi (Maedi-Visna Virusü ilişkili)², Infectious Bursal Disease Virus¹⁷, Avian Reovirus¹⁸, Hantavirus¹⁹, Bovine Herpesvirus 1⁴⁸ ve Şap virusunun^{27,33} arandığı rapor edilmiştir. Bunların yanında koyunlarda "Scrapie"⁴³ gibi prion-ilişkili hastalıkların tanısı ve sığır prion⁴⁶ genlerinin tanımlanmasında da pratik bir biçimde LC sistemlerinin kullanıldığı gözlenmiştir.

Kaynaklar

1. Baigent S.J., Petherbridge L.J., Howes K., Smith L.P., Currie R.J., Nair V.K. 2005. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. J Virol Methods., 123, 53-64.
2. Brinkhof J.M.A., van Maanena C., Wigger R., Peterson K., Houwers D.J. 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Meth., 147, 338-344.
3. Bruno J.G., Carrillo M.P., Phillips T. 2008. Development of DNA aptamers to a foot-and-mouth disease peptide for competitive FRET-based detection. J Biomol Tech., 19, 109-115.
4. Cai H.Y., Bell-Rogers P., 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.
5. Caplin B. E., Rasmussen R., Bernard P.S., Wittwer C.T. 1999. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *Biochemica.*, 1, 1-8.
 6. Carli K. T., Eyigor A. 2003. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Trachea *Avian Dis.*, 47, 712–717.
 7. Chen H.Y., Li X.K., Cui B.A., Wei Z.Y., Li X.S., Wang Y.B., Zhao L., Wang Z.Y.A. 2009 TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. *J Virol Methods.*, 156, 84-8.
 8. Chuang Y.C., Yang C.H., Lin J.H., Wang K.C., Cheng C.P., Yeh K.S. 2008. Primers specific for the fimbrial major subunit gene *stdA* can be used to detect *Salmonella enterica* serovars. *J Food Prot.*, 71,1108-1113.
 9. Clemente L., Barahona M.J., Andrade M.F., Botelho A. 2009. Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. *Vet Rec.*, 21;164, 373-374.
 10. Eyigor A., Carli K.T., Unal C.B. 2002. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Lett Appl Microbiol.*, 34, 37-41.
 11. Eyigor A., Carli K.T. 2003. Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Dis.*, 47, 380-386.
 12. Eyigor A., Goncagul G., Gunaydin E., Carli K.T. 2005. *Salmonella* profile in chickens determined by real-time polymerase chain reaction and bacteriology from years 2000 to 2003 in Turkey. *Avian Pathol.*, 34,101-115.
 13. Fearnley C., Wakeley P.R., Gallego-Beltran J., Dalley C., Williamson S., Gaudie C., Woodward M.J. 2008. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res.Vet. Sci.*, 85, 8–16.
 14. Fitzmaurice J., Sewell M., King C.M., McDougall S., McDonald W.L., O'Keefe J.S.A. 2008. Real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma agalactiae*. *N Z Vet J.*, 56, 233-236.
 15. Heddema E. R., Beld M. G. H. M., de Wever B., Langerak A. A. J., Pannekoek Y., Duim.B. 2006. Development of an internally controlled real-time PCR assay for detection of *Chlamydophila psittaci* in the LightCycler 2.0 system. *Clin Microbiol Infect.*, 12, 571–575.
 16. Hoelzle L. E., Helbling M., Hoelzle K., Ritzmann M., Heinritzi K., Wittenbrink M.M. 2007. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. *J Microbiol. Meth.*, 70, 346–354.
 17. Jackwood D.J., Sommer S. E. 2002. Identification of Infectious Bursal Disease Virus Quasispecies in Commercial Vaccines and Field Isolates of This Double-Stranded RNA Virus. *Virology*, 304, 105–113.
 18. Ke G.M., Cheng H. L., Ke L.Y., Ji W.T., Chulu J. L.C., Liao M. H., Chang T. J., Liu H. J. 2006. Development of a quantitative LightCycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus *J Virol Meth.*, 133, 6–13.
 19. Kramski M., Meise H., Klempa B., Kruger D.H., Pauli G., Nitsche A. 2007. Detection and Typing of Human Pathogenic Hantaviruses by Real-Time Reverse Transcription-PCR and Pyrosequencing *Clinical. Chemistry*, 53,1899–1905.
 20. Krumbholz A., Wurm R., Scheck O., Birch-Hirschfeld E., Egerer R., Henke A., Wutzler P., Zell R. 2003. Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J Virol Meth.*, 113, 51–63.
 21. Lee M.A., Brightwell G., Leslie D., Bird H., Hamilton A., 1999. Fluorescent detection techniques for real-time multiplex strand specific detection of *Bacillus anthracis* using rapid PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 218–223.
 22. Lee S.H., Jung B.Y., Rayamahji N., Lee H.S., Jeon W.J., Choi K.S., Kweon C.H., Yoo H.S. 2009. A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica*. *J Vet Sci.*, 10, 43-51.
 23. Liu L., Xia H., Belák S., Baule C. 2008. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *J Virol Methods.*, 154, 82-85.
 24. Lorenzon S., Manso-Silvan L., Thiaucourt F. 2008. Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol Cell Probes.*, 22,324-328.
 25. Lyon E., Wittwer C.T. 2009. LightCycler Technology in Molecular Diagnostics. *J Mol Diagn.*, 11, 93-101.
 26. Mitchell S.L., Wolff B.J., Thacker W.L., Ciembor P.G., Gregory C.R., Everett K.D., Ritchie B.W., Winchell J.M. 2009. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.*, 47, 175-181.
 27. Moonena P., Boonstra J., Hakze- van der Honing R., Boonstra- Leendertse C., Jacobs L., Dekker A. 2003. Validation of a LightCycler-based reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Meth.*, 113,35–41.

28. Munir K., Kibenge F.S.B. 2004. Detection of infectious salmon anaemia virus by real-time RT-PCR. *J Virol Meth.*, 117, 37–47.
29. Murata S., Chang K.S., Lee S.I., Konnai S., Onuma M., Ohashi K. 2007. Development of a nested polymerase chain reaction method to detect oncogenic Marek's disease virus from feather tips. *J Vet Diagn Invest.*, 19, 471–478.
30. Nitsche A., Buttner M., Wilhelm S., Pauli G., Meyer H. 2006. Real-Time PCR Detection of Parapoxvirus DNA, *Clin Chem.*, 52, 316-319.
31. O'Mahony J., Hill C. 2004. Rapid Real-Time PCR Assay for Detection and Quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in Artificially Contaminated Milk. *Appl. Environ Microbiol.*, 70, 4561–4568.
32. O'Regan E., McCabe E., Burgess C., McGuinness S., Barry T., Duffy G., Whyte P., Fanning S. 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol.*, 21;156.
33. Oem J.K., Kye S.J., Lee K. N., Kim Y.J., Park J.Y., Park J.H., Joo Y.S., Song H.J. 2005. Development of a Lightcycler-based reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Vet. Sci.*, 6, 207–212.
34. Premanandh J., George L.V., Wernery U., Sasse J. 2003. Evaluation of a newly developed real-time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* and discrimination from *T. asinigenitalis*. *Vet Microbiol.*, 95, 229–237.
35. Prikhod'ko G. G., Reyes H., Vasilyeva I., Busby T.F. 2003. Establishment of a porcine parvovirus (PPV) DNA standard and evaluation of a new LightCycler nested-PCR assay for detection of PPV. *J Virol Meth.*, 111, 13-19.
36. Raviv Z., Callison S.A., Ferguson-Noel N., Kleven S.H. 2008. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Vet. Microbiol.*, 129, 179–187.
37. Raviv Z., Kleven S.H. 2009. The Development of Diagnostic Real-Time TaqMan PCRs for the Four Pathogenic Avian *Mycoplasmas*. *Avian Dis.*, (yayma Kabul edildi).
38. Ridley A. M., Allen V. M., Sharma M., Harris J.A., Newell D.G., 2008. Real-Time PCR Approach for Detection of Environmental Sources of *Campylobacter* Strains Colonizing Broiler Flocks. *Appl Environ Microbiol.*, 74, 2492–2504
39. Rine K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.*, 245, 154-160.
40. Ritzmann M., Grimm J., Heinritzi K., Hoelzle K., Hoelzle L.E. 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Vet. Microbiol.*, 133, 84–91.
41. Rodriguez-Sanchez B., Sanchez-Vizcaino J.M., Uttenthal A., Rasmussen T.B., Hakhverdyan M., King D.P., Ferris N.P., Ebert K., Reid S.M., Kiss I., Brocchi E., Cordioli P., Hjerner B., McMenamy M., McKillen J., Ahmed J.S., Belak S. 2008. Improved diagnosis for nine viral diseases considered as notifiable by the world organization for animal health. *Transbound Emerg Dis.*, 55, 215-225.
42. Schonenbrucher H., Abdulmawjood A., Failing K., Bulte M. 2008. New Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bovine Feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2751–2758
43. Schutz E., Scharfenstein M., Brenig B. 2006. Genotyping of Ovine Prion Protein Gene (PRNP) Variants by PCR with Melting Curve Analysis, *Clin Chem.*, 52, 1-4.
44. Taylor M.J., Hughes M.S., Skuce R.A., Neill S.D. 2001. Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Specimens Using Real-Time Fluorescence and Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Rapid-Cycle PCR. *J Clin Microbiol.*, 39, 1272–1278.
45. Thürmer A., Helbig J.H., Jacobs E., Lück P.C. 2009. PCR-based 'serotyping' of *Legionella pneumophila*. *J Med Microbiol.*, 58, 588-595.
46. Tichopad A., Pfaffl M.W., Didier A. 2003. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. *Mol. Cell. Probes*, 17, 5–10.
47. Wang G., Liveris D., Brei B., Wu H, Falco R. C., Fish D., Schwartz I. 2003. Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Quantification of *Borrelia burgdorferi* in Field-Collected *Ixodes scapularis* Ticks from the Northeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4561–4565.
48. Wang J., O'Keefe J., Orr D., Loth L., Banks M., Wakeley P., West D., Card R., Iyata G., Maanen K.V., Thoren P., Isaksson M., Kerkhofs P., 2008. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Vet. Microbiol.* 126, 11–19.
49. Wittwer C.T., Fillmore G.C., Hillyard D.R. 1989. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Res.*, 17, 4353-4357.
50. Wittwer C.T., Fillmore G.C., Garling D.J. 1990. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem.*, 186, 328-331.
51. Wittwer C.T., Garling D.J. 1991. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques.*, 10, 76-83.

52. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification., *Biotechniques.*, 22,130-138.
53. Wittwer C.T., Rine K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J. 1997. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.*, 22,176-181.
54. Woo T. H. S., Patel B. K. C., Smythe L. D., Norris M.A., Symonds M.L., Dohnt M. F. 1998. Identification of Pathogenic *Leptospira* by TaqMan Probe in a LightCycler. *Anal. Biochem.*, 256, 132–134.
55. Zaayman D., Human S., Venter M. 2009. A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real-time PCR. *J Virol Methods.*, 157, 155-160.