Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.
32 (2013), 2: 39-44

Enfeksiyöz Hayvan Hastalıklarının Teşhisinde Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR'ın Geleneksel PCR'a göre Avantajları

Serpil KAHYA[1] Özge YILMAZ[2] K. Tayfun CARLI[1]

Geliş Tarihi: 13.03.2014
Kabul Tarihi: 28.04.2014

Özet: Enfeksiyöz hayvan hastalıkları, hayvan hastalıkları içerisinde en önemli grubu oluşturmakta ve enfeksiyöz hastalıklarının önemli bir bölümü, insan sağlığı için de tehlike arz etmektedir. Zaman kısıtlılığı, pratiklik, sensitivite ve spesifite yüksekliği gibi birçok sebeplerle, teşhis ve epidemiyolojik çalışmalar, günümüzde daha çok moleküler yöntemlerle devam ettirilmektedir. Son yıllarda en hızlı gelişim gösteren, kendisinden önce ve sonra geliştirilen birçok moleküler metotun temelini oluşturan, hem teşhis hem de epidemiyolojik çalışmalarda en çok kullanılan moleküler metot, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dır. İlk gelişiminden bu yana birçok temele dayanılarak çalışılmış olan PCR, son geliştirilen gerçek zamanlı (real-time) sistemlerle, artık daha çok gerçek zamanlı [Real Time (RT)] olarak çalışılmaya devam edilmektedir. PCR'ın ilk şekli olan, geleneksel PCR, birçok laboratuarda kullanılmaya devam etmekte ve sonraları geliştirilen RT PCR teknolojisi de, kullanılan alet ve kitlerde her geçen gün yapılan güncelleştirmelerle, pek çok alanda yaygınlığını artırmaya devam etmektedir. Bu derlemede; geleneksel PCR'a göre birçok yönden avantajlar sağlayan RT PCR'ın özellikle sonuçların; kalitesi, ortaya çıkış süresi ve yorumlamalarına sağladığı avantajlardan bahsedilecektir.

Anahtar Kelimeler: Enfeksiyöz Hayvan Hastalıkları, Teşhis, Konvansiyonel PCR, Real-Time PCR.

Advantages of Real-Time PCR than Conventional PCR in Diagnosis of Infectious Animal Disease

Abstract: Infectious animal diseases are the most important disease group among all the animal diseases and also have risks for human health. Because of time, practicality, high sensitivity and specificity etc., diagnosis and epidemiologic studies are going on molecular field. Polymerase Chain Reaction (PCR) is most fast-developing molecular method, also basic of lots of molecular methods developed before and/or after PCR and the most wide-using molecular method in diagnosis and epidemiologic studies at the present day. Basis of PCR has different systems from past to present and now it is using generally with real-time (RT) systems developed lately. Conventional PCR and its systems are still using in lots of laboratory, but RT technology is developing at tool and kits and is going to up-to-date and common with this evolutions. In this review will be mentioned the advantage of RT PCR than conventional PCR, especially at quality of results, time-saving and advantages at result-cover.

Key Words: Infectious animal diseases, diagnosis, conventional polymerase chain reaction (PCR), Real-Time (RT) PCR.

[1] Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Bursa, 16059, Türkiye, serpilkahya@uludag.edu.tr
[2] Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobioloji ABD, 16059, Bursa, Türkiye.

Giriş

Enfeksiyöz Hastalıkların Teşhisinde Kullanılan Metotlar

Hayvan hastalıkları teşhisinde kullanılan farklı temellere dayanan birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler genel olarak; etkenin kendisinin tespitine dayanan izolasyon yöntemleri (bakteriyolojik yada virolojik yöntemler), etkenin vücutta oluşturduğu immun sistem tepkisi sonucu oluşan antikorların tespitine dayanan serolojik yöntemler ve etkenin nükleik asitinin tespitine dayanan moleküler yöntemler olarak gruplandırılabilir. Geleneksel teşhis metotlarından en önemlisi olan etkenin direkt olarak kendisinin tespitine dayanan izolasyon yöntemleri, altın-standart yöntemler olarak kabul edilirler. Ancak bakteriyel izolasyonun birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bakteriyel izolasyonun mutlaka sadece bu amaçla kurulmuş çok iyi koruma şartlarına sahip laboratuvarlarda çalışılması gerekmektedir. Elde edilecek etkene göre, izolasyon-identifikasyon ve istenirse daha sonra yapılabilecek antibiyogram sonuçlarının elde edilmesi, 3 günden 2 aya kadar bir süre gerektirmektedir. Alınan örneklerde canlı etkenin olmamasından kaynaklanan yada örneklerin alınırken başka mikroorganizmalarla kontamine edilmesi sonucu yanlış negatiflikler meydana gelebilmektedir. İzolasyon sonrası yapılacak identifikasyon testleri, çoğu durumda yetersiz kalmakta ve kesin sonuç elde edebilmek için, saf kültürlerle ve büyük bir özen içinde çalışılmaları gerekir. Bu kadar özenle yapılan identifikasyon testleri, yeterli sonuçlar veremeyip tekrar ek biyokimyasal testler yapılmasını bile gerektirebilmektedir. Kısaca bahsedilen tüm bu nedenler, izolasyon ve identifikasyonun, çok uzun süren ve dolayısıyla acil sonuç alınması gereken durumlarda, çok uygun olmayan yöntem olduğunu göstermektedir[3,7].

Serolojik metotlar da hastalıkların farklı açıdan teşhisini sağlayan (antikor miktarı) geleneksel metotlar olarak kabul edilmektedirler. Serolojik metotların da sağladıkları avantajlar kadar dezavantajları da bulunmaktadır. Antikor tespitine dayanan serolojik yöntemlerde de [çabuk lam aglütinasyon (ÇLA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) vb...] antikorların tespit edilebilmesi için, antikorların yüksek olduğu dönemlerde örnek alınmasının gerekebilmesi gibi nedenlerle, yine yanlış negatiflik sorun oluşturabilmektedir. Yetiştiricilikte viral ve bakteriyel hastalıklar için kullanılan inaktif aşıların da, ELISA ve ÇLA testinde non-spesifik reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir[10,41]. Örneğin, özellikle inaktif aşılardan sonra, 2-4 hafta süreyle serolojik testlerin yapılmaması gerekmektedir. Aşıdan dolayı olan bu yanlış pozitiflikler, aşılamadan 4-8 hafta ya da daha uzun süre devam edebilmektedir[19,25]. Kanatlı hayvanlarda, dehidrasyon ve lipitlerle ilgili yanlış pozitifliklerden dolayı ve esas aglutinasyon veren antikor olan IgM, günlük civcivlere geçmediği için günlük civcivlerde ÇLA testi geçerli olmaz. Bunun dışında enfeksiyon sonrası örnekleme çok yakın olmamalıdır, antibiyotik tedavi sonrası, etken tam giderilememiş olsa da antikor cevabı azalmış olabilir, tüm mikroorganizmalar humoral immun yanıtı aynı düzeyde uyaramayabilirler, yaşlı kanatlı hayvanların gençlere göre serumlarında daha fazla non-spesifik faktörün bulunabileceği gibi birçok sebebin ÇLA ve diğer serolojik testlerin kullanımını kısıtladığı, serolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır[1,8,14,17,26,35,37]. Bu ve bunun gibi pek çok nedenlerden dolayı, serolojik testlerin sonuçları yorumlanırken tüm bu faktörler göz önünde bulundurulmalıdır[22].

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleik asitlerin tespitinde ve nükleik asitlerle ilgili çalışmalarda kullanılan oldukça sensitif ve spesifik bir moleküler tekniktir[27]. Spesifik DNA ve RNA bölgelerinin tespiti, DNA sekanslanması, parmak izi tabanlı amplifikasyon yöntemleri, kültür edilemeyen mikroorganizmaların teşhisi ve mutasyonların tespiti gibi daha birçok amaçla kullanılmaktadır[22].

Deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) dizilerinin sayısal olarak artırılması esasına dayanan PCR'ın en önemli yönü, özel bir DNA dizisinin seçilip çoğaltılarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasının önlenebilmesidir. Bu özellik, test edilen örnekler içerisinde aranan bölgenin olup olmadığının görülmesini kolaylaştırmakla kalmayıp, aynı zamanda bölgenin çok miktarda kopyası elde edileceğinden, daha ileri tekniklerle DNA'nın analiz edilmesini de sağlamaktadır[33,38]. Hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile PCR'la homojen bir DNA materyali haline getirilip çoğaltılabilir ve böylece kolayca identifiye edilebilirler[6,33,34,38].

Doğal enfeksiyonlarda kuluçka süresinin çok uzayabilmesi, bulaşmanın yavaş olması ve klinik semptomlar gözlendiğinde çok gecikmiş olunabileceği için enfeksiyonun sık taramalarla takibi çok önem kazanır. PCR ile yakın türler

arasında ya da alt tipler arasında ayırım yapılabilir ve klinik örnekler ön zenginleştirmeye gereksinim duymadan, kısa sürede çalışılabilirler. Doğal konaklarının dışında üretilmesi çok zor olan ve bu nedenle tespit edilemeyen mikroorganizmaların teşhisinde de, PCR testinin çok büyük önemi bulunmaktadır[32].

Günümüzde insan ve hayvanların enfeksiyöz hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik çalışmaları, PCR tabanlı tekniklerin uygulamaya sokulmasıyla olağanüstü bir hız kazanmıştır. Bakteri, virüs, mantar veya parazitin izolasyonu ve identifikasyonu için, oldukça uzun ve zahmetli bir dizi laboratuvar işleminin yapılmasını gerektiren uygulamalara PCR'ın devreye girmesiyle gerek kalmamıştır[8].

Real Time PCR

İlk geliştirdiği yıllardan beri takip edilmesi oldukça zor olan, sürekli güncellemeler ve geliştirilen sistemlerle, kullanımı yaygınlaşmaya devam eden PCR tabanlı sistemler, genel olarak geleneksel ve Real-Time (RT) tabanlı sistemler olarak 2 gruba ayrılarak değerlendirilebilirler. Geleneksel PCR tabanlı testler, çoklu kompleks basamaklar ve bu nedenle uzmanlaşmış kişiler gerektiren, örneklerin dışarıdan başka DNA'larla kontaminasyon riskini artıran açık reaksiyon sistemleridir. Bu testlerin kompleksliliğine bir de maliyet yüksekliği eklenmektedir[9,13]. Ayrıca, PCR reaksiyonundan sonra oluşan PCR ürününü görebilmek için, agaroz jel elektroforezis, sourthern blot, ELISA benzeri sistemlerden yararlanılması gerekebilmektedir. Bu sistemler tatminkar sonuçlar verseler de PCR sonrası oluşan ürünü ortaya koymak için yapılan bu işlemlerin yoruculuğu, iş gücü kaybı ve artan kontaminasyon riski kaçınılmaz olmaktadır[12,15,28]. Aynı zamanda, aynı büyüklükte nonspesifik amplifikasyon ürünleri de yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir.

Bu sebeplerle PCR sonrası oluşan ürünlerin özgünlüğünü artırmak için proba dayalı southern ya da mikropleyt hibridizasyon teknikleri de kullanılabilmektedir. Bu teknikler ise, ancak büyük miktardaki örneklerle kolay ve hızlı sonuçlar sağlayabilmektedirler. Ayrıca bu metotların bazıları, amplifikasyon ve deteksiyonun aynı yerde olmasından kaynaklanan kontaminasyon riski taşımaktadırlar. PCR uygulamalarının ana problemlerinden birini de zaten farklı kaynaklardan gelebilecek kontaminasyonlardan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar oluşturmaktadır[15,28,40]. PCR'ın tespit limitinin kültür ve geleneksel PCR metotlarına göre 10-1000 kat daha yüksek olduğunu bildirilmiştir. Çalışılan örneklerde aranan etkenin, birçok sebepten kaynaklanabilecek az miktarda olması durumu söz konusu ise, RT PCR yüksek tespit limiti ile doğru sonuçlar verebilmektedir. Bu ve buna benzer birçok sebep ve kullanılması gereken ek malzeme, zaman kaybı, iş gücü kaybı gibi daha birçok sebep de geleneksel tabanlı PCR testlerinin kaçınılmaz dezavantajlarını oluşturmaktadır.

PCR reaksiyonu kinetik olarak 3 fazda gerçekleşir. Bunlar eksponensiyal, lineer ve plato fazlarıdır. PCR reaksiyonu tüm sikluslarda mükemmel etkinlikle devam etmez. Belirli bir siklustan sonra ortamda kullanılan reagentler ve bu reagentlerin etkinlikleri azalmaya başlar ve reaksiyon son faz olan plato fazına ulaşır. İstenilen ürünün 0.3-1 pmol civarına ulaşması ile birlikte, oluşan ürünün logaritmik olarak azalmasına plato etkisi denir. Bu etkinin nedeni, substrat kullanımının azalması, enzimin kararsız hale gelmesi, son ürün inhibisyonu, spesifik ürün inhibisyonu veya primer-dimer yapışması ve ürünün tam olarak denatüre olamamasıdır[36]. Zaten reaksiyon bileşenleri, DNA'yı ancak belli bir miktara kadar etkili bir şekilde amplifiye edebilir ve PCR reaksiyonunun sonunda reaksiyonun başlangıcındaki DNA'yı doğru bir şekilde ölçebilmek mümkün değildir. Yani reaksiyonun başında ne kadar spesifik DNA'nın olduğu ve dolayısıyla reaksiyonun sonunda bununla orantılı olarak ne kadar spesifik DNA oluştuğunu, geleneksel PCR'la ölçüm yaptığımız son faz olan plato fazında ölçmek mümkün değildir[40]. Real-Time PCR etkin ve doğru ölçümün yapılabildiği eksponensiyal faz boyunca spesifik DNA'nın ölçümünü yaparak geleneksel PCR'a karşı avantaj sağlamaktadır. Bu ölçüm, reaksiyonun başlangıcındaki spesifik DNA miktarıyla orantılı olduğu için, miktar tayini yapılmasına da imkan sağlamaktadır[31,40].

RT PCR, 1980 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilen, araştırmacılara istenilen genin spesifik bölgesinin 1 milyondan fazla kez çoğaltılmasını sağlayan PCR'ın, çok önemli ve yeni bir versiyonudur[11,40]. RT PCR sistemleri, amplifikasyonunu ve amplifiye olmuş ürünün (amplikon) kontrolünü aynı kapalı sistemlerde gerçekleştiren ve amplikonun görüntülenmesine izin veren, gıdalardan, memeli genomundan, genetik olarak geliştirilmiş organizmalardan, insan ve veteriner mikrobiyoloji alanlarındaki çok farklılık gösterebilen örneklerden nükleik asitlerin aranmasında kullanılmaya devam edilmektedir[2,24,30].

1966'dan beri etidyum bromürün nükleik asitlere bağlandığında floresanını artırdığı bilinmektedir. Bu floresan kimyası PCR'la ve gerçek zamanlı videografiyle birleşince 1990'ların başlarında RT PCR'ın doğmasını sağlamıştır[11,16]. Bu aletler, sıcaklık değişimini konvansiyonel termocyclerlara göre çok daha hızlı bir şekilde gerçekleştirirler ve her PCR siklusu sonunda, hedef DNA'ya nükleik problar veya floresan boyalar bağlandıktan sonra açığa çıkan floresanı tespit eden sistemlere sahiptirler[13]. EtBr ya da SG I gibi DNA bağlayan boyalar, hidroliz problar, hibridizasyon problar, moleküler beaconlar, sunrise ve scorpion primerler ve peptit nükleik asit light-up problar gibi çeşitli sistemler mevcuttur. Bu sistemlerin hepsi meydana gelen ürünün her siklusta analizini sağlamaktadır[40].

Roche moleküler sistemler özel şirketine bağlı olarak Higuchi ve arkadaşları[20] RT PCR sistemlerini ilk kez geliştiren kişilerdir. Daha sonra ticari olarak satılan birçok RT cihazı piyasaya çıkartılmıştır ve çıkartılmaya devam etmektedir. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar cihazların optik sistemleri ve özellikle kullanılan floresan boyaların eksitasyon ve emisyon dalga boyları, ısıtma türüne bağlı olarak reaksiyon hızları ve aynı anda paralel uygulanabilen reaksiyon sayısı kapasiteleridir. Ticari olarak satılanlardan Stratagene M × 3000 p, M × 3005p ve M×4000, Applied Biosystems 7300 ve 7500, Chromo4, Smart Cycler, Rotor-Gene, LC en fazla kullanılanlardır[15].

RT PCR, geleneksel PCR'ın uygulama alanlarını genişletirken, PCR ile ilgili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde, DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskleriyle, güvenle çalışılabilmektedir. RT PCR'da, PCR reaksiyonu sırasında oluşan ürünleri görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyalar kullanılmakta, ve oluşan flouresan DNA ile doğru orantılı olarak arttıkça reaksiyon sırasında sonuçlar görülebilmekte, tüm bunlar tek bir tüpte ve tek bir işlemle belirlenebilmektedir[11,16,29,39].

RT PCR'ın en önemli yararlarından birisi de araştırıcının DNA'nın başlangıç seviyesi çok az miktarda olsa dahi bu seviyenin belirlenmesine imkan vermesidir. Amplifikasyon sürecinde örnekteki DNA ne kadar yüksekse, floresan sinyal o kadar çabuk eşik seviyesine çıkmakta bu da miktar tayinini mümkün kılmaktadır[40]. DNA'nın başlangıç seviyesinden bağımsız olarak, sadece negatif ve pozitif olarak sonuç veren geleneksel PCR'da ise miktar tayini oldukça zor olmaktadır. RT PCR ile kros kontaminasyon ve çevresel kontaminasyon riski çok aza indirgenir. Testi yapan kişiden kaynaklanan yanlışlıklar olasılığı da, test süreci içinde yapılan işlem sayısı azaldığı için düşmektedir[4,5,28].

Sonuç

Morbidite ve mortalitesi yüksek, etken izolasyonu zor yada imkansız olan ya da özel laboratuar sistemleri ve her mikroorganizma için uzmanlaşmış kişileri ve acil teşhisi gerektiren durumlarda, enfeksiyonların yaygınlaşmadan kontrol altına alınabilmesi için PCR sistemleri günümüzde en önemli teşhis metodlarıdır.

Gen anlatımının analizini değiştiren, RT PCR ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmişdir. Birçok isimlendirme yapılan Real-Time teknolojisi literatürde 'kinetik PCR', 'homojen PCR', 'kantitatif Real-time PCR' gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir[11,18]. Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme, mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme, tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, single nükleotid polimorfizm (SNP) analizi ve kromozom bozukluklarının tespiti gibi pek çok alanda da RT PCR'ın kullanımı mümkündür[18,23]. Bu metot, protein seviyesi ve fonksiyonlarındaki potansiyel farklılıklar gibi biyolojik proseslerin daha iyi anlaşılması için de oldukça kullanışlıdır. Geleneksel PCR'a göre daha çok avantaja sahip olan RT PCR teknolojisi, günümüzde en hızlı gelişen ve oldukça fazla alanlarda avantaj sağlayan teknik olarak teşhis ve epidemiyolojik alanlardaki tüm çalışmalara da temel olmaya ve hız kazandırmaya devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Ahmad I., Kleven S.H., Glisson J.R., Avakian A.P.,1989. Further studies of *Mycoplasma gallisepticum* serum plate agglutination antigen growth in medium with artificial liposomes substituting for serum. Avian Diseases, 33, 51-526.
2. Ahmed F.E., 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnology, 20, 215-223.
3. Akgün Y., 1996. Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri. Editör: Nuray Serter. Mikrobiyoloji. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, No: 490,

Açıköğretim fakültesi yayınları, No: 219. Ünite 16, Eskişehir, pp. 259-265.

4. Anonim, 2008. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 1.1.5, Ofise International Epizootic terrestrial Manual, Paris.
5. Anonim, 2009. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine developments. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 1.1.7. Office International Epizootics Terrestrial Manual, Paris.
6. Arda M., 1995. Biyoteknoloji (bazı temel ilkeler). Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, No: 3, Ankara.
7. Arda M., 2000. Bakteriyal İzolasyon, İdentifikasyon. Temel Mikrobiyoloji, 28. Bölüm. Medisan Yayın Serisi, No: 46, genişletilmiş 2. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, pp. 268-272.
8. Avakian A.P., Kleven S.H., Glisson J.R.,1988. Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test and the hemaglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases, 32, 262-272.
9. Berry O., Sarre S.D., 2007. Gel-free species identification using melt-curve analysis. Molecular Ecolology Notes, 7, 1-4.
10. Bradbury J.M., McCarthy J.D., Metwalf A.Z.,1990. Microimmunofluorescence for the serological diagnosis of avian *Mycoplasma* infections. Avian Pathology, 19, 213-222.
11. Bustin S.A., 2000. Absolute quantificatication of m RNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193.
12. Cockerill F.R., Smith T.F., 2002. Rapid-cycle real-time PCR: A revolution for clinical microbiology. American Society for Microbiology News, 68, 77-83.
13. Cockerill F.R., 2003. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Archieves of Pathology and Laboratory Medicine, 127, 1112-1120.
14. Ewing M.L., Kleven S.H., Brown M.B., 1996. Comparision of enzyme linked immunosorbent assay and hemaglution inhibition for detection of antibody to *Mycoplasma gallisepticum* in commercial broiler, fair and exhibition and experimentally infected birds. Avian Diseases, 40, 13-22.
15. Evans J.D., Thornton D.L., Branton S.L., 2009. Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from broiler breeder flock: comparision of three diagnostic methods. İnternational Journal of Poultry Science, 8, 104-107.
16. Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M., 1996. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. Genome Research, 6, 995-1001.
17. Güler L., 1995. Konya bölgesinde kanatlıların kronik solunum yolu hastalığı (chronic respiratory diseases-CRD)' nin serolojik ve etken izolasyonu ile karşılaştırmalı teşhisi üzerine çalışmalar. Veterinarium, 6, 7-15.
18. Günel T., 2007. Gen anlatımının kantitatif analizi "Real-Time PCR". Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 27, 763-767.
19. Gökçelik G., 2008. *Mycoplasma* infeksiyonlarının teşhisi ve serolojik izleme programlarının önemi. Veteriner Tavukçuluk Derneği Dergisi, 1, 6-11.
20. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology, 10, 413–417.
21. Johnson J.R., 2000. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. Journal of Microbiological Methods, 41, 201-209.
22. Kahya S., 2009. Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* aranması için LightCycler (LC) Polymerase Chain Reaction (PCR) sisteminin optimizasyonu. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bursa.
23. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects in Medicine, 27, 95-125.
24. Klein D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, 8, 257-260.
25. Kleven S.H., Yoder H.W., 1984. *Mycoplasmosis.* Editörler: Purchase H.G., Arp L.H., Domermuth C.H., Pearson J.E. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3th edition, American Association of Avian Pathologists, Kenet Square, Pennsylvania, pp. 57-62.
26. Kleven S.H., 1975. Antibody response to avian *Mycoplasmas.* American Journal of Veterinary Research, 36, 563-565.
27. Leutenegger C.M., 2001. The Real-Time Taqman PCR and Applications in Veterinary Medicine. Veterinary Sciences, Tomorrow, 1-15.
28. Mackay I.M., 2004. Real time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10, 190-212.
29. Mekkes D.R., Feberwee A., 2005. Real time polymerase chain reaction for qualitative and quantitave detection of *Mycoplasma gallisepticum.* Avian Pathology, 34, 348-354.

30. Mhlanga M.M., Malmberg L., 2001. Using Molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. Methods, 25, 463-471.

31. Raymaekers M., Smets R., Maes B., Cartuyvels R., 2009. Checklist for optimization and validatin of Real-Time PCR assays. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 23, 1445-151.

32. Sachse K., 2004. Specifity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. Molecular Biotechnology, 26, 61-79.

33. Saiki K.R., Gelfand H.D., Stoffi S., Scharf J.S., Higuchi R., Horn T.G., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.

34. Schochetman G., Jones K.W., 1998. Polymerase Chain Reaction. Journal of Infectious Diseases, 158, 1154-1157.

35. Snell G.C., Cullen G., 1978. An evaluation of rapid serum agglutination inhibition tests for *Mycoplasmosis* in Turkeys. Brazilian Veterinary Journal, 138, 198-204.

36. Şahin F., Çiftçi M., Pirim İ., 2000. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR). II. Uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri kurs notları. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi.

37. Türkaslan J., Salihoğlu H., 1989. Çeşitli besiyerleri kullanılarak *Mycoplasma gallisepticum*'un bakteriyolojik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu. Pendik Hayvan Hastalıkları Merkezi Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2, 53-59.

38. Walker J., Douan G., 1989. DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. Journal of Applied Microbiology, 67, 229-230.

39. Walker N.J., 2002. A technique whose time has come. Science, 296, 557-559.

40. Valasek M.A., Repa J.J., 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29, 151-159.

41. Yoder H.W.,1989. Nonspesific reactions to *Mycoplasma* serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. Avian Diseses, 33, 60-68.