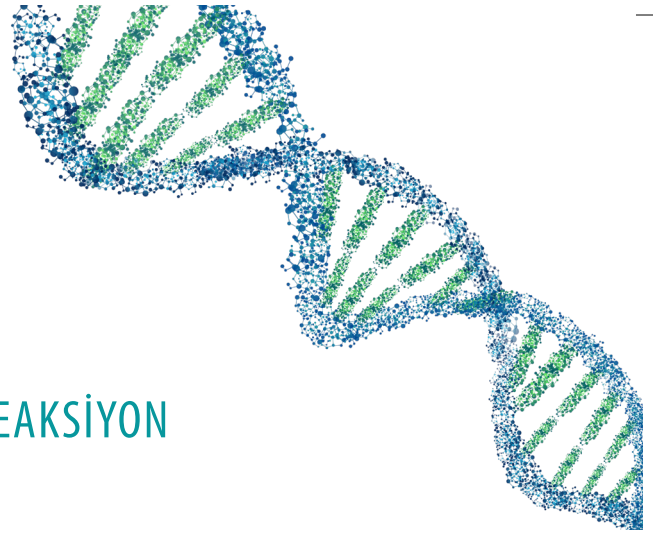


BÖLÜM 7

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON YÖNTEMİNİN TİPLERİ VE PRENSİPLERİ



Oğuz ARI¹

Rıza DURMAZ²

Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction (PCR)] yönteminin kullanımı, tıbbın çeşitli alanlarındaki araştırmaları büyük ölçüde hızlandırmış ve bu teknoloji sayesinde birçok araştırma alanında bilgi düzeyinde önemli ölçüde artış olmuştur. PCR kullanımındaki en önemli dönüm noktalarından biri reaksiyon devam ederken artan floresans tayini yoluyla nükleik asit amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak izlenmesine olanak sağlayan, aynı zamanda kantitatif PCR [kantitatif PCR (qPCR)] olarak da ifade edilen **gerçek zamanlı PCR [real-time PCR (Rt-PCR)]** konseptinin ortaya çıkmasıdır¹.

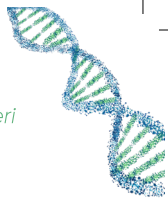
Rt-PCR yönteminde, oluşturulan kantitasyon eğrisi yardımıyla örnekteki hedef DNA veya RNA'nın mutlak miktarının belirlenmesi mümkün hale gelmiştir². Ayrıca, Rt-PCR işlemi standart numuneler olmadan yarı nicel sonuçlar da sağlamaktadır. Bu durumda, gözlemlenen sonuçlar referans alınan gene göre daha yüksek veya düşük katlar olarak ifade edilebilir. Rt-PCR'nin bu uygulamasın-

da gerçek zamanlı revers transkripsiyon (RT) PCR (**rRT-PCR**) yöntemi uygulanarak mRNA'nın relatif kantitasyonu yoluyla hedef genin ekspresyon düzeyi belirlenebilmektedir³. Örneğin, eflüks pompası ve *OprD* porin proteinlerinin ekspresyon düzeyindeki değişiminin *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarında karbapenem direncine etkileri incelenebilir⁴. Ancak mutlak kantitatif değerler elde edilemediğinden, kesin kantitasyon gerektiren mikrobiyolojik çalışmalarda yarı nicel sonuç veren bu yöntem yaygın kullanım bulmamıştır³.

Rt-PCR yönteminin getirdiği en önemli faydalardan birisi de tek bir tüpte birden fazla hedefin tespit edebilmesine olanak tanımasıdır. **Multipleks Rt-PCR** adı verilen bu uygulamada, her biri farklı floresan boya ile etiketlenmiş probler kullanılmaktadır. Her boyadan gelen sinyal, aynı tüpteki farklı bir hedefin miktarını hakkında bilgi vermektedir. Bu sayede birkaç hedefin miktarı veya ilgilenilen genlerin ekspresyon seviyeleri tek bir çalışmada hızlı bir şekilde ölçülebilmektedir¹.

¹ Öğr. Gör. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı, Ankara, oguz.ari61@gmail.com

² Prof. Dr. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Ankara, rdurmaz@ybu.edu.tr



genotiplerin belirlenmesi gibi alanlarda önemli bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda Rt-PCR, DNA ve RNA virüslerinin tanısında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir ⁴⁰⁻⁴². Örneğin HCV enfeksiyonunun tanısı, artık serolojik testlerden, serumdaki viral genomun yüksek doğrulukla saptanması, kantitasyonu ve genotiplerinin belirlenmesine olanak tanıyan rRT-PCR uygulamasına doğru evrilmiştir.

Bazı protozoon enfeksiyonlarının geleneksel yöntemlerle tanısında yetersizlikler vardır. Bu ajanların saptanması için kullanılan mikroskopik inceleme işlemleri zahmetli olmasının yanı sıra, zaman alıcı ve özel olarak eğitilmiş personel gerektirir. Benzer şekilde, serolojik testlerin de düşük duyarlılık ve özgüllük gibi sorunları vardır. Bu nedenle, Rt-PCR, protozoonların rutin tespiti, miktar tayini ve tiplendirilmesinde güçlü bir araç olarak ortaya çıkmaktadır ⁴³. Örneğin, *Plasmodium* tespitinde PCR tabanlı analizlerin, tüm geleneksel yöntemlerden daha duyarlı ve daha özgül olduğu bilinmektedir ⁴⁴.

Virüs ve protozoonların saptama ve kantitasyonunun aksine, tıp, veterinerlik ve gıda güvenliği açısından önemli birçok bakterinin tespiti ve kantitasyonunda kültür halen altın standart olarak kabul görmektedir. Ancak bulaşıcı hastalıklar için zamanında müdahalenin kritik olduğu durumlarda, yavaş ve çok aşamalı geleneksel kültür teknikleri makul sürede sonuç vermemektedir. Bu sınırlamaya, geç ve güç üreyen patojenlerin üretilmesi, tür tayini, virülans faktörlerinin tanımlanması ve antimikrobiyal direnç profillerinin ortaya çıkarılması gibi gereklilikler de eklendiğinde Rt-PCR yönteminin önemi ortaya çıkmaktadır. Rt-PCR bu bilgilerin tamamını kısa sürede sağlama yeteneğine sahiptir ⁴⁵. Klinik örnekte *Mycobacterium tuberculosis* tespitinde, özellikle çok ilaca dirençli (MDR) ve yaygın ilaç dirençli (XDR) suşlarının belirlenmesinde geleneksel yöntemler yetersiz kaldığından multipleks Rt-PCR yöntemine dayanan kitler yaygın olarak kullanılmaktadır ⁴⁶. Benzer şekilde patojenik *Escherichia coli* suşlarının tespiti, direnç ve virülans genlerinin incelenmesinde de Rt-PCR yöntemlerine başvurulmaktadır ⁴⁷.

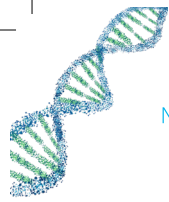
Rt-PCR'nin enfeksiyonların tanısında kullanımı konusu bu kitabın farklı bölümlerinde ayrıntılı olarak ele alındığı için burada özet olarak değinilmiştir.

Sonuç

Rt-PCR teknolojisi, ortaya çıkışından itibaren tıbbın birçok alanında en sık kullanılan yöntemlerden biri olmuştur. Oldukça farklı seçenekler sunan floresan boyaları ve prob teknolojisindeki gelişmeler yönteme ayrı bir ivme kazandırmıştır. Gen ekspresyon seviyesini belirlemekten, klinik örnekteki etkenin mutlak kantitasyonuna kadar geniş alanda ölçümler yapabilmesi ve kısa sürede doğru sonuçlar üretmesi Rt-PCR'nin mikrobiyolojik tanıda güçlü bir araç olmasını sağlamıştır. Özellikle viral tanı, genotiplerin belirlenmesi ve tedavinin takibinde Rt-PCR artık baskın bir rol oynamaktadır. Bakteriolojik tanı alanında ise özellikle hızlı sonuç verebilmesi, antimikrobiyallere direnç profili, virülans faktörleri ve alt tiplerin belirlenmesi gibi analizlerin yapılmasını olanaklı kılması, bu yöntemin gelecekte kültüre alternatif olmasını sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex analyses using real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol* 2017;1546: 125-33.
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25(3).
3. Rocha D, Castro TLP, Aguiar E, Pacheco LGC. Gene expression analysis in bacteria by RT-qPCR. *Methods Mol Biol* 2020;2065: 119-37.
4. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldi O, Aydogan S, et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Infect Dev Ctries* 2018;12(1): 1-8.
5. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39(1): 75-85.
6. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem* 2002;303(1): 95-8.
7. Schmitz JE, Stratton CW, Persing DH, Tang YW. Forty years of molecular diagnostics for infectious diseases. *J Clin Microbiol* 2022: e0244621.
8. Peri AM, Harris PNA, Paterson DL. Culture-independent detection systems for bloodstream infection. *Clin Microbiol Infect* 2022;28(2): 195-201.
9. Esfahani A, Omran AN, Salehi Z, Shams-Ghahfarokhi M, Ghane M, Eybpoosh S, et al. Molecular epidemiology, antifungal susceptibility, and ERG11 gene mutation of Can-



- did species isolated from vulvovaginal candidiasis: Comparison between recurrent and non-recurrent infections. *Microb Pathog* 2022;170: 105696.
10. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta* 2006;363(1-2): 32-47.
 11. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol* 2017;8: 108.
 12. Eischeid AC. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes* 2011;4: 263.
 13. Mardis E, McCombie WR. Library quantification using SYBR Green-quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2017;2017(6): pdb prot094714.
 14. Li L, Hu Z, Sun J, Guo K, Chu X, Wang X, et al. Development of an EvaGreen-based real-time PCR assay for detection of Aleutian mink disease virus. *J Virol Methods* 2020;275: 113751.
 15. Wajahat W, Azad Z, Nazir S, Nasir G. Real Time-PCR coupled with melt curve analysis for detecting the authenticity of camel milk. *J Food Sci Technol* 2022;59(4): 1538-48.
 16. Roth R, Madhani HD, Garcia JF. Total RNA isolation and quantification of specific RNAs in Fission Yeast. *Methods Mol Biol* 2018;1721: 63-72.
 17. Klafke GM, Miller RJ, Tidwell JP, Thomas DB, Sanchez D, Feria Arroyo TP, et al. High-resolution melt (HRM) analysis for detection of SNPs associated with pyrethroid resistance in the southern cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2019;9: 100-11.
 18. Buh Gasparic M, Tengs T, La Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem* 2010;396(6): 2023-9.
 19. Aijuka M, Buys EM. Detection of extended-spectrum beta-lactamase cefotaxime resistance and virulence genes in *Escherichia coli* by duplex quantitative real-time PCR and melt curve analysis. *Lett Appl Microbiol* 2020;71(1): 54-60.
 20. Devi TS, Durairaj E, Lyngdoh WV, Duwarah SG, Khyriem AB, Lyngdoh CJ. Real-time multiplex polymerase chain reaction with high-resolution melting-curve analysis for the diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol* 2018;36(4): 547-56.
 21. Demuth J, Kantor M, Kucera R, Miletin M, Novakova V. Comparison of quenching efficiencies in long triple-labeled and double-labeled TaqMan oligodeoxynucleotide probes. *Bioconjug Chem* 2022;33(5): 788-94.
 22. Johansson MK. Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers. *Methods Mol Biol* 2006;335: 17-29.
 23. Navarro E, Serrano-Heras G, Castano MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015;439: 231-50.
 24. Carters R, Ferguson J, Gaut R, Ravetto P, Thelwell N, Whitcombe D. Design and use of scorpions fluorescent signaling molecules. *Methods Mol Biol* 2008;429: 99-115.
 25. Li G, Li W, Guo F, Xu S, Zhao N, Chen S, et al. A novel real-time PCR assay for determination of viral loads in person infected with hepatitis B virus. *J Virol Methods* 2010;165(1): 9-14.
 26. Wan C, Chen C, Cheng L, Chen H, Fu Q, Shi S, et al. Specific detection of Muscovy duck parvovirus infection by TaqMan-based real-time PCR assay. *BMC Vet Res* 2018;14(1): 267.
 27. Junager NP, Kongsted J, Astakhova K. Revealing nucleic acid mutations using forster resonance energy transfer-based probes. *Sensors (Basel)* 2016;16(8).
 28. Farrell RE. Quantitative PCR Techniques. *Rna methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, 5th Edition. 2017: 283-328.
 29. Vilaivan T. Fluorogenic PNA probes. *Beilstein J Org Chem* 2018;14: 253-81.
 30. Kuzio S, Hanguhard A, Morelle M, Ronsin C. Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan trade mark probe. *J Immunol Methods* 2004;287(1-2): 179-86.
 31. Lundin KE, Hojland T, Hansen BR, Persson R, Bramsen JB, Kjems J, et al. Biological activity and biotechnological aspects of locked nucleic acids. *Adv Genet* 2013;82: 47-107.
 32. Alvandi E, Koohdani F. Zip nucleic acid: a new reliable method to increase the melting temperature of real-time PCR probes. *J Diabetes Metab Disord* 2014;13(1): 26.
 33. Gupta A, Mishra A, Puri N. Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications. *J Biotechnol* 2017;259: 148-59.
 34. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005;5(2): 209-19.
 35. Bonacorsi S, Visseaux B, Bouzid D, Pareja J, Rao SN, Manissero D, et al. Systematic review on the correlation of quantitative PCR cycle threshold values of gastrointestinal pathogens with patient clinical presentation and outcomes. *Front Med (Lausanne)* 2021;8: 711809.
 36. Kuypers J, Jerome KR. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 2017;55(6): 1621-8.
 37. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 2013;54(4): 391-406.
 38. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 2013;3(3): 71-85.
 39. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* 2015;119(5): 1219-33.
 40. Cassidy A, Parle-McDermott A, O'Kennedy R. Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods. *Front Mol Biosci* 2021;8: 637559.
 41. Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2013;19(44): 7896-909.
 42. Chiopris G, Veronese P, Cusenza F, Procaccianti M, Perrone S, Dacco V, et al. Congenital cytomegalovirus infection: Update on Diagnosis and Treatment. *Microorganisms* 2020;8(10).
 43. Rijsman LH, Monkelbaan JF, Kusters JG. Clinical consequences of polymerase chain reaction-based diagnosis of intestinal parasitic infections. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31(11): 1808-15.
 44. Berry A, Benoit-Vical F, Fabre R, Cassaing S, Magnaval JF. PCR-based methods to the diagnosis of imported malaria. *Parasite* 2008;15(3): 484-8.
 45. Tsalik EL, Bonomo RA, Fowler VG, Jr. New molecular diagnostic approaches to bacterial infections and antibacterial resistance. *Annu Rev Med* 2018;69: 379-94.
 46. Machado D, Couto I, Viveiros M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes to genomes. *Infect Genet Evol* 2019;72: 93-112.
 47. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(1): 1-14.