



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADINLARDA DÜŞÜK ETKENİ ZOONOTİK BAKTERİLERİN
İDENTİFİKASYONU için SİMPLEKS ve MULTİPLEKS PZR
PROTOKOLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

DİLŞAD SARP

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
EYLÜL - 2020**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KADINLARDA DÜŞÜK ETKENİ ZOONOTİK BAKTERİLERİN
İDENTİFİKASYONU için SİMPLEKS ve MULTİPLEKS PZR
PROTOKOLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

DİLŞAD SARP
ORCID:0000-0002-1747-6537

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Birgül ÖZCAN
ORCID: 0000-0001-9003-8480

HATAY
EYLÜL - 2020

29/09/2020

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Dilşad SARP

ÖZET

KADINLARDA DÜŞÜK ETKENİ ZOONOTİK BAKTERİLERİN İDENTİFİKASYONU için SİMPLEKS ve MULTİPLEKS PZR PROTOKOLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Zoonotik bakteriler kadınlarda düşüğe neden olabilen önemli enfeksiyon ajanları olarak kabul edilmektedir. Kadınlarda düşüğe neden olan mikrobiyal ajanların diğer hastalıklarda görülen benzer semptomlara sahip olması, hastalık etmeni olduğu düşünülen mikroorganizmaların birlikte değerlendirmeye alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Etkenlerin tek tek araştırılmasının zor, zaman alıcı ve yüksek maliyetli olmasının yanısıra yüksek düzeyde biyogüvenlik ve teknik gereksinimlerinin bulunması ve serolojik testlerin yanlış pozitiflik verme olasılığı nedeniyle çoklu, aynı anda ve yüksek doğrulukta analiz olanağı sağlayan moleküler metotları tercih edilir kılınmaktadır.

Bu çalışmada spontan düşüklere neden olduğu bilinen zoonotik bakterilerden *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* ve *Listeria monocytogenes* tanısı için simpleks/multipleks PZR protokolü geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Brucella abortus (IS711, omp2b), *Coxiella burnetii* (com1, IS1111a), *Chlamydia abortus* (ompA, pmp 90/91) ve *Listeria monocytogenes* (hly, iap)'in gen bölgelerine spesifik tasarlanan ve ilk kez bu çalışmada kullanılan primer çiftleri ile önce simpleks PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonrasında her bir organizma için seçilen primer çiftleri ile farklı ikili ve üçlü kombinasyonlarda dubleks ve tripleks olmak üzere multipleks PZR'ler yapılmıştır. Farklı DNA konsantrasyonları ile yapılan amplifikasyon çalışmaları sonucunda seçilen primerlerin hassasiyet ve spesifiteleri kalitatif olarak belirlenmiştir.

B. abortus için BaisF2/BaisR2 (304 bp), *C. burnetii* için CbısF3/CbısR3 (430 bp), *C. abortus* için CapmpF3/CapmpR3 (588 bp) ve *L. monocytogenes* için LmhlyF1/LmhlyR1 (526 bp) primer çiftlerinin yüksek hassasiyet ve spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Bu primer çiftleri ile tüm kombinasyonlar göz önüne alınarak yapılan dubleks ve tripleks PZR çalışmaları sonucunda ilgili bölgelerin 10⁻¹ konsantrasyondaki kalıp DNA varlığında net amplifikasyonu gözlenmiştir. Çalışmamıza özgün tasarlanmış primerlerle gerçekleştirilen multipleks PZR protokolü, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* ve *Listeria monocytogenes* türlerinin aynı anda tanısına olanak sağlayacaktır.

2020, 76 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Listeria monocytogenes*, multipleks PZR

ABSTRACT

DEVELOPMENT of SIMPLEX and MULTIPLEX PCR PROTOCOLS for the IDENTIFICATION of ABORTIVE ZOONOTIC BACTERIA in WOMEN

Zoonotic bacteria can be considered as important infectious agents that can cause miscarriage in women. Microbial agents that cause miscarriage in women have similar symptoms seen in other diseases. This situation reveals the necessity to evaluate all factors thought to cause the disease. Investigating each factor individually is difficult, time consuming and costly, it requires biosafety practices and technical skills. For this reason, molecular methods that provide multiple analyzes are preferred because of the false positivity in serological tests of the disease in the acute period.

It was designed primer pairs specifically for the genes sequence of *Brucella abortus* (IS711, *omp2b*), *Coxiella burnetii* (*com1*, IS1111a), *Chlamydia abortus* (*ompA*, *pmp 90/91*) and *Listeria monocytogenes* (*hly*, *iap*). These primer pairs were designed specifically for this study, first time. Firstly, simplex PCR studies were carried out with the primer pairs selected for each organism then multiplex PCR studies including duplex and triplex in different double and triple combinations were carried out with the primer pairs selected for each organism. The sensitivity and specificity of the primers selected as a result of amplification studies with different DNA concentrations were qualitatively determined.

Primer pairs; BaisF2/BaisR2 (304 bp) for *B. abortus*, CbisF3/CbisR3 (430 bp) for *C. burnetii*, CapmpF3/CapmpR3 (588 bp) for *C. abortus* and LmhlyF1/LmhlyR1 (526 bp) for *L. monocytogenes* were showed high sensitivity and specificity. Duplex and triplex PCR studies were carried out to all combinations with these primer pairs. As a result, clear amplification of the relevant genes sequences in the presence of 10^{-1} concentration of template DNA was observed. Multiplex PCR protocol performed with primers specially designed for our study will allow simultaneous diagnosis of *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* and *Listeria monocytogenes* species.

2020, 76 pages

Key Words: *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Listeria monocytogenes*, multiplex PCR

TEŞEKKÜR

Mesleki ve akademik hayatımda önemli kararlar almam gerektiğinde sürekli yanımda olan ve varlığı ile benim için önemli bir rol model oluşturan, gerek doktora tez konumunun belirlenmesinde gerek araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmalarına ışık tutan ve yardımını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Birgül ÖZCAN ve yakın zamanda kaybettiğimiz rahmetli Doç. Dr. Zafer CANTEKİN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Yaşar ERGÜN ve Dr. Öğr. Üyesi Hasan YILDIZ'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan HMKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nizami DURAN'a, Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK, Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN ve Arş. Gör. Dr. Hasret ECEVİT'e, maddi destek veren Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 18.D.003) ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarımda yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle Arş. Gör. Erhan TEK ve Emrah AY'a çok teşekkür ederim.

Her daim desteğini esirgemeyen sevgili dostum Nihal GÜNDOĞAN'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve daima yanımda olan annem, babam, kardeşlerime ve ikinci ailem olan SARP ailesine sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Sabırla, sevgiyle her zaman her konuda desteğini hissettiğim hayatıma anlam katan sevgili eşim Koray SARP'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Brucella abortus</i>	2
1.2. <i>Coxiella burnetii</i>	5
1.3. <i>Chlamydia abortus</i>	8
1.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Bakteriyel DNA	20
3.2.2. Primer Dizaynı ve Seçimi.....	20
3.2.3. Simpleks PZR.....	31
3.2.4. Multipleks PZR	32
3.2.4.1 Dupleks PZR	32
3.2.4.2 Tripleks PZR	32
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	34
4.1. Primerlerin Belirlenmesi	34
4.2. Simpleks PZR sonuçları	37
4.2.1. <i>Brucella abortus</i> simpleks PZR sonuçları	38
4.2.2. <i>Coxiella burnetii</i> simpleks PZR sonuçları	41
4.2.3. <i>Chlamydia abortus</i> simpleks PZR sonuçları	45
4.2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> simpleks PZR sonuçları	47
4.3. Multipleks PZR sonuçları.....	50
4.3.1. Dupleks PZR sonuçları.....	54
4.3.2. Triplex PZR sonuçları	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>Brucella abortus</i> 'a ait IS711 gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu	23
Şekil 3.2. <i>Brucella abortus</i> 'a ait omp2b gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu	24
Şekil 3.3. <i>Coxiella burnetii</i> 'ye ait com1 gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu	25
Şekil 3.4. <i>Coxiella burnetii</i> 'ye ait IS1111a gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu	26
Şekil 3.5. <i>Chlamydia abortus</i> 'a ait ompA gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu	27
Şekil 3.6. <i>Chlamydia abortus</i> 'a ait pmp 90/91 gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu	28
Şekil 3.7. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e ait hly gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin NCBI BLAST sonucu	29
Şekil 3.8. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e ait iap gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu	30
Şekil 4.1. <i>B. abortus</i> IS711 geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	39
Şekil 4.2. <i>B. abortus</i> omp2b geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	39
Şekil 4.3. <i>C. burnetii</i> com1 geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	42
Şekil 4.4. <i>C. burnetii</i> IS1111a geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	43
Şekil 4.5. <i>C. abortus</i> ompA geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	46
Şekil 4.6. <i>C. abortus</i> pmp 90/91 geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	46
Şekil 4.7. <i>L. monocytogenes</i> hly geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	48
Şekil 4.8. <i>L. monocytogenes</i> iap geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	49
Şekil 4.9. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan dublex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	55
Şekil 4.10. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan dublex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	56
Şekil 4.11. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan triplex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	57
Şekil 4.12. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan triplex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>B. abortus</i> , <i>C. burnetii</i> , <i>C. abortus</i> , <i>L. monocytogenes</i> 'e ait gen bölgeleri ve GenBank erişim numaraları	21
Çizelge 3.2. PZR Protokolü	31
Çizelge 3.3. PZR Koşulları	31
Çizelge 4.1. Seçilen primer çiftleri	34
Çizelge 4.2. Primer çiftlerinin hassasiyet ve spesifiteleri	51
Çizelge 4.3. Seçilen primer çiftleri	54
Çizelge 5.1. Her bir organizma için her bir gen bölgesine ait primerlerin seçimi	63
Çizelge 5.2. Dupleks PZR aşamasındaki hassasiyet ve spesifite	64
Çizelge 5.3. Tripleks PZR aşamasındaki hassasiyet ve spesifite	65



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

µl	: mikrolitre
µM	: mikromolar
bp	: base pare (baz çifti)
C	: Sitozin nükleotidi
dk	: dakika
G	: Guanin nükleotidi
gr	: gram
mM	: milimolar
°C	: Santigrat derece
pmol	: pikomol
sn	: saniye
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BSL	: Biosafety Level (Biyogüvenlik Seviyesi)
CDC	: Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: dinükleotittrifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
NCBI	: National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE	: Tris-Borate-EDTA
T _m	: Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)

1. GİRİŞ

Günümüzde laboratuvar tekniklerinin hızlı gelişim göstermesiyle moleküler metotlar birçok alanda yaygınlaşmış ve giderek standart tanı tekniklerinin yerini almaya başlamışlardır. Konak organizmada bakteri/lerin varlığını gösteren doğrudan yöntemler, en objektif teşhis prosedürleridir ancak bu yöntemler aynı zamanda zor, zaman alıcı ve tehlikeli de olabilmektedir (Richtzenhain ve ark., 2002). Dolayısıyla klinik örneklerden mikroorganizmaları izole etmenin hem tehlike içermesi ve hem de laboratuvar iş yükü gerektirmesi nedeniyle geleneksel uygulamalar yerini çeşitli mikroorganizma türlerinin teşhisinin yapıldığı moleküler yöntemlere bırakmaya başlamıştır. Spesifite ve hassasiyet gibi önemli özelliklere sahip polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), hem teşhis hem de epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen yöntemlerden biridir. Nobel ödüllü bilim adamı Kary Mullis tarafından 1983 yılında geliştirilen PZR, etken DNA'daki bir veya birden fazla genin, spesifik primerler, ısı ve enzim yardımıyla in-vitro ortamda çoğaltılması ve görüntülenmesi esasına dayanmaktadır (Mullis, 1990; Devrim ve Kaya, 2004). Dolayısıyla PZR, spesifik etiyolojik etkenin belirlenmesini, özellikle yavaş gelişme gösteren etkenlerin teşhisini, hastalıktan korunma ve tedavi etkinliğinin artırılmasını mümkün kılmıştır (Mirnejad ve ark., 2013). Bu yöntem tek bir etkenin belirlenmesi için (Simpleks PZR) kullanılabildiği gibi uygun oranda hazırlanmış uyumlu primerler ve optimize edilmiş protokoller kullanılarak birden çok etkenin belirlenmesi için de (Multipleks PZR) kullanılabilmektedir. Multipleks PZR (mPZR) tanı yöntemi Chamberlain ve ark. (1988) tarafından tanımlanmış olup, tek bir reaksiyonla birden fazla hedef bölgenin çoğaltılabilmesi ve farklı etkenlerin teşhisi ya da aynı etkene ait farklı özellikleri kodlayan genlerin varlığının belirlenmesi mümkün olabilmektedir (Henegariu ve ark., 1997; Markoulatos ve ark., 2002; Lynch ve Brown, 1990). Multipleks PZR'de tek bir reaksiyondan birden fazla DNA kalıbı kopyalanıp çoğaltılabildiği için kullanılan malzeme ve zaman gibi faktörler yönünden simpleks PZR'ye göre avantajlara sahip olmaktadır. Dolayısıyla kısa zaman içerisinde yüksek spesifite ve hassasiyetle hızlı identifikasyon ve farklı patojenlerin eş zamanlı tespiti yapılabilmektedir. Günümüzde moleküler tabanlı uygulamalardan mPZR, gerek insan gerekse zoonotik öneme sahip hastalıkların tanısında veya aynı etkenin farklı özelliklerinin belirlenmesinde veya

etkenlerin tiplendirilmesinde tercih edilir hale gelmiştir (Baud ve Greub, 2011; Mateus ve ark., 2013; Garshasbi ve ark., 2014).

Mikrobiyolojik ve epidemiyolojik öneme sahip bir yöntem olan PZR, insan ve hayvanlarda görülen enfeksiyonların teşhisinde önemli bir yer tutmakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Sağladığı avantajlar nedeniyle düşüklere yol açan gebelik dönemi enfeksiyon etmenlerinin teşhisinde de PZR yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. Gebelik sırasında teşhisi yapılamayan fetal enfeksiyonlar, plasenta hasarı ve çeşitli mekanizmalarla düşüğe, ölü doğuma veya erken doğuma neden olabilmektedir (Baud ve Greub, 2011). Mikroorganizmalar düşük veya prematüre doğumlara tek başlarına sebep olabilmektedirler ve varlıkları serum spesifik antikorlarla belirlenebilmektedir. Ancak bu tip serolojik metotlarda birçok faktör nedeniyle yanlış pozitif ve negatif sonuçlar alınabildiğinden, tahmini yorumların yapılmasına neden olmaktadır (Richtzenhain ve ark., 2002). Ayrıca çoğu kez annede ya da koryoamniyonitin histolojik bulgularında, yüksek inflamatuvar marker seviyeleri görülmesine rağmen herhangi bir patojen tanımı da yapılamamaktadır. Klinik örneklerden insan patojenlerini tespit etmek için rutinde kullanılan besiyerlerinde üremeyen hücre içi bakteriler, bu komplikasyonların etiyolojik ajanları olabilmektedir. Birden fazla etkenin benzer semptomlarla seyreden hastalıklara neden olması, hastalık durumunda düşünülen etkenlerin tümünün araştırılmasını gerektirir ve bu işlemler zaman alıcı olmakla birlikte yüksek maliyete sebep olmaktadır (Herman ve Ridder, 1992; Wang ve ark., 2014). Simpleks/multipleks PZR tekniği ile daha etkin ve daha hızlı bir tanı sağlanması, multipleks PZR ile tek bir test ile birden fazla etkenin tanımlanabilmesi, zaman ve kullanılan sarf malzeme açısından önem arz etmektedir. Ayrıca bakteriyel etkenlerin doğru tespiti tedavi şansını arttırmaktadır. PZR, daha fazla taramanın yapılmasını, hamilelik sırasında daha yüksek doğrulukta ajan tespit edilebilmesini ve hücre içi mikroorganizmaların patogenezi hakkında daha geniş bilgi edinimini sağlamaktadır (Baud ve Greub, 2011).

1.1. *Brucella abortus*

Dünya çapında dağılım gösteren ve bruselloza neden olan *Brucella* türleri hareketsiz, kapsülsüz, sporsuz, gram-negatif kokabasil, granülositler ve monositler içinde hayatta kalabilen hücre içi organizmalardır (Corbel ve Banai, 2006; Baud ve Greub, 2011;

Karcaaltıncaba ve ark., 2010; Mirnejad ve ark., 2013; Probert ve ark., 2004). Bruselloz, insanlar dâhil olmak üzere çok çeşitli memeli türünü etkileyen *Brucella* türlerinin yol açtığı bakteriyel bir enfeksiyondur (Glynn ve Lynn, 2008). Sığır, koyun, keçi, köpek ve domuzlar ana rezervuarlardır. Birçok hayvan için patojenik olan *Brucella* türleri retiküloendotelyal sistemde lokalizasyonu izleyen bir bakteriyemik faz ile sıklıkla enfeksiyon oluşturmakla birlikte genellikle genital bölgede yerleşim göstererek düşüğe neden olmaktadır. Doğal konaklardaki enfeksiyonlar genellikle hafif olmakla beraber nadiren öldürücüdür ve klinik belirtiler esas olarak gebe hayvanlarda ortaya çıkmaktadır. Gebe hayvanlarda hastalık genellikle plasental ve fetal enfeksiyonla seyretmektedir. Organizmalar meme dokusunda lokalize olup süte geçebilmektedir. Süt üreten hayvanların birçoğu bruselloza yatkın olduğundan; hayvanlarla doğrudan ya da dolaylı temasın yanı sıra süt veya et ürünlerinin tüketimi ile insan enfeksiyonları sıklıkla görülmektedir (Corbel ve Banai, 2006). Çoğunlukla *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis* insanlarda enfeksiyona neden olan türler olarak bilinmekte ve kişiden kişiye bulaşma oldukça nadir olarak görülmektedir (Corbel ve Banai, 2006; Baud ve Greub, 2011; Mirnejad ve ark., 2013).

İnsan brusellozu yılda 500.000'den fazla yeni vaka ile dünya çapında en yaygın zoonoz hastalık olmakla birlikte Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tahminlerine göre hastalığın gerçek sıklığının rapor edilen sayıdan yaklaşık 10-25 kat daha fazla olduğu varsayılmaktadır (Baud ve Greub, 2011; Pappas ve ark., 2006; Al Dahouk ve Nöckler, 2011; Vilchez ve ark., 2015). Birçok ülkede hastalığın kontrol altına alınmasında büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, hayvanlardan insana bulaşma sık sık yaşanmaktadır. Hastalık mesleki olarak veya çevresel temas yoluyla enfekte olmuş hayvanlar ve bunların ürünleri ile doğrudan veya dolaylı olarak insanlara bulaşmaktadır. Süt üreticileri, hayvancılıkla uğraşanlar, mezbaha çalışanları, çobanlar, veteriner hekimler, et işleme işçileri ve laboratuvar çalışanlarının enfekte olma riski yüksektir ve mesleki tehlike içermektedir (Nimri, 2003). Dünya çapında, insan ve hayvanlarda görülen hastalıkla mücadelenin büyük ekonomik kayıplara neden olduğu belirtilmektedir (Ali ve ark., 2016; Seleem ve ark., 2010; Sofian ve ark., 2008; Romero ve ark., 1995).

Brusellozun görüldüğü bölgelerde enfeksiyonun yayılması ve prevalansı yemek alışkanlıkları, süt ürünleri ve süt işleme yöntemleri, hayvancılık uygulamaları, sosyal gelenekler, iklim koşulları, sosyo-ekonomik durum ve çevresel hijyen gibi çeşitli

faktörlere bağılı olmaktadır (Mirnejad ve ark., 2017). Bruselloz, özellikle Ortadoğu’da, endemik ve enzootik olarak değışen derecelerde olmak üzere; Avrupa’da, Afrika’da, Güney ve Orta Asya’da ve Güney Amerika’da görülen önemli bir hastalıktır (Karcaaltıncaba ve ark., 2010; Glynn ve Lynn, 2008). Yıllık en yüksek insidans oranları, aralarında Suriye, Irak, İran ve Suudi Arabistan’ında olduğu, Orta Dođu ülkelerinden bildirilmektedir (Pappas ve ark. 2006). Geçmişte; Fransa, İsrail ve Latin Amerika bölgelerinde hastalık kontrol altına alınmıştır (Karcaaltıncaba ve ark., 2010). Gelişmiş ülkelerde hastalığın kontrol edilebilmesine rağmen birçok ülkede klinik olarak halen yaygın olup, bazı bölgelerde halk sağığı tehdidi olarak varlığını sürdürmektedir (Mirnejad ve ark., 2017).

İnsanlarda bruselloz multisistemik bir hastalık olarak kendini göstermektedir (Baud ve Greub, 2011). Ciddi komplikasyonları olan akut veya kronik ilerleyebilen, ateşli sinsi bir hastalık olarak görülmekle birlikte ilk bulgular genellikle nonspesifiktir. İnsanlarda brusellozun kuluçka süresi 5 günden 5 aya kadar inkübasyon süresi ise ortalama 2 ila 3 hafta arasında değışebilmektedir. Akut enfeksiyon fark edilmeyebilir ve yıllar sonra tekrarlayan semptomlarla, kronik bir enfeksiyona neden olabilmektedir. Yaygın belirtiler; halsizlik, uykusuzluk ve eklem ağrısıdır. Spesifik klinik bulguları, sistemik bulgulara göre daha az yaygın olmakla birlikte; artrit, organ tutulumu ve genitoüriner işaretler genel olarak sırasıyla gelişebilmektedir (Probert ve ark., 2004; Glynn ve Lynn, 2008).

Brusellozun keçi, koyun ve köpek gibi doğal konaklarında düşük komplikasyonuna neden olduğu göz önüne alındığında insanlarda da düşüklere neden olabileceğı düşünülebilir. Ancak *Brucella* türlerinin insanda düşüğe neden olduğuna dair kesin kanıtlar bulunmamaktadır. Bruselloz enfeksiyonu olduğuna dair klinik belirtileri olan gebe kadınlar arasında kendiliğinden düşük, prematüre doğum, intrauterin enfeksiyonu ve fetüs ölüm oranlarının arttığı bildirilmiştir (Vilchez ve ark., 2015; Baud ve Greub, 2011). Gebelik boyunca görülen bruselloz kendiliğinden düşük veya bebeğe intrauterin bulaşma riski taşımaktadır ve tedavi edilmeyen gebeliklerde, yenidoğanda ciddi sekellere neden olabilmektedir (Glynn ve Lynn, 2008; Ali ve ark., 2016; Baud ve Greub, 2011). Hamilelik esnasında brusellozun hızlı teşhis ve tedavisi, fetüste hayat kurtarıcı olabilmektedir. Brusellozun klinik tablosu öylesine tuhaf ve değışkendir ki diğər bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıklarla kolayca karıştırılabilir, bu da tanı gecikmelerine ve tedavinin geç başlamasına neden olmaktadır (Al Dahouk ve Nöckler, 2011). Bu nedenle

laboratuvar tanısı zorunludur. Bruselloz teşhisi için mikrobiyolojik, serolojik ve moleküler teknikler olmak üzere üç ana yaklaşım bulunmaktadır (Wang ve ark., 2014; Garshasbi ve ark., 2014). Hastalığın klinik özelliği spesifik olmadığı için hastalığı teşhis etmenin en güvenilir yolu, bakterinin kandan veya enfekte olmuş dokulardan kültürle izole edilmesidir (Mirnejad ve ark., 2013). Bununla beraber kan kültürünün zaman alıcı olması ve *Brucella* türlerinin sınıf III patojen grubunda olmasından dolayı laboratuvar personeli için potansiyel bir enfeksiyon tehlikesi içermektedir (Prakash ve ark., 2019; Yu ve Nielsen, 2010). Ayrıca numune türü, örnekleme zamanı (hastalığın evresi), izolasyon tekniği ve numune hazırlama ekipmanı gibi faktörler de kültürasyonun başarısını etkilemektedir (Young, 1991). Bruselloz için laboratuvar tanısı genellikle bakterilerin izolasyonu veya anti-*Brucella* antikorlarının saptanmasıyla olmaktadır. Bakterilerin izolasyonu “altın standart” olmasına rağmen, uzun inkübasyon süreleri gerektirdiğinden nadiren başarılı olmaktadır. Kültürasyonun yetersiz ya da yapılamaması durumunda bruselloz teşhisi serolojik testlerle yapılmaktadır (Saytekin ve Ak, 2018; Nimri, 2003; Zahidi ve ark., 2015; Garshasbi ve ark., 2014). Ancak endemik bölgelerde, *Brucella* spp.’ye maruz kalanlarda, brusellozun nüks ettiği bireylerde veya yakın zamanda bruselloz geçmişi olan hastalarda bu testlerin özgüllüğü düşüktür (Nimri, 2003; Christopher ve ark., 2010). Ayrıca özellikle antikorun üretim hızının düşük olduğu hastalığın erken aşamalarında doğru sonuçlar alınamamaktadır. *Brucella*’nın geleneksel fenotipik yöntemler kullanılarak tanımlanması ve ayırt edilmesi zahmetli ve zaman alıcı olduğundan, bu sorunların üstesinden gelmek için moleküler yaklaşımlar araştırılmıştır. Bu nedenle, dünyanın farklı bölgelerinde, farklı *Brucella* türlerini ayırt etme gücüne sahip moleküler tanı teknikleri günümüzde teşhis için kullanılmaktadır (Zahidi ve ark., 2015; Corbel ve Banai, 2006; Mirnejad ve ark., 2013). Polimeraz zincir reaksiyonunun geliştirilmesinden sonra birçok çalışmada olduğu gibi bruselloz tanısı için de moleküler temelli yöntemlerin kullanılmasının faydalı olacağı açıktır (Herman ve Ridder, 1992; Romero ve ark., 1995; Matar et al., 1996; Queipo-Ortuño ve ark., 1997).

1.2. *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii gram negatif, küçük, zorunlu hücre içi kokobasil şeklinde bir bakteri olup dünya çapında önemli dağılıma sahip zoonotik bir ajandır (Raoult ve ark.,

2005; Maurin ve Raoult, 1999; Eyigör ve ark., 2013; Cumbassá ve ark., 2015; Carcopino ve ark., 2009). Amerika Birleşik devletleri (ABD) Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından B kategorisi biyolojik ajanı olarak sınıflandırılan *C. burnetii*'nin, neden olduğu Q ateşi hastalığı; organizmanın endemik olduğu bölgelerde en büyük halk sağlığı sorunlarından biri olmaktadır (Fournier ve ark., 2003; Howe ve ark., 2009; Vaidya ve ark., 2008). *Coxiella burnetii* enfeksiyonu geniş bir klinik spektruma sahiptir. Akut veya kronik enfeksiyon şeklinde gelişmekle birlikte genellikle yetişkinler asemptomatiktir. Ancak pnömoni veya hepatit ile kombinasyonu hastalığın spesifik bir şekilde seyretmesine neden olmaktadır (Quijada ve ark., 2012; Giakoumelou ve ark., 2016; Parker ve ark., 2006).

Coxiella burnetii, çoğunlukla kene, memeli, kuş ve eklem bacaklıları içeren geniş rezervuara sahip oldukça bulaşıcı bir bakteridir (Baud ve Greub, 2011). *Dermacentor* spp. türü kene ısırığı ile hayvanlara bulaşmakta, enfekte hayvanların doğum atıklarıyla insana bulaşma gerçekleşmektedir (Carcopino ve ark., 2009). Hem evcil hem de yabani hayvan plasentalarının enfeksiyon rezervuarı olduğu ve doğum sırasında aerosol yolu ile kontaminasyona neden oldukları bilinmektedir (Stein ve Raoult, 1998). Doğum sırasında enfekte plasenta ile kirlenen toprakta organizma yıllarca canlı kalabilmektedir (Baud ve Greub, 2011). Kontamine toprak ve plasenta haricinde kurumaya dirençli olan *C. burnetii* idrar, dışkı, süt ve kırılmış yünden de solunum yoluyla bulaşabilmektedir (Raoult, 1993; Maurin ve Raoult, 1999; Quijada ve ark., 2012; Tissot-Dupont ve ark., 2007; Parker ve ark., 2006). Bunların yanı sıra insanlarda enfeksiyona en fazla neden olan kaynak; sığır, keçi ve koyun gibi çiftlik hayvanlarıdır (Howe ve ark., 2009). Ayrıca kedi, köpek gibi evcil hayvanlardan ve vahşi yaşamdan da organizma izole edilmiştir (Carcopino ve ark., 2009; Baud ve Greub, 2011; Howe ve ark., 2009; Angelakis ve Raoult, 2010). *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu enfeksiyon hastalığı gıda yolu ile de bulaşabilmektedir. Örneğin pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinden mikroorganizma bulaşabilmektedir. Q ateşinin kan transfüzyonu, cinsel yolla ve insandan insana direkt temas ile bulaştığı tespit edilmiştir (Fournier ve ark., 2003; Baud ve Greub, 2011; Eyigör ve ark., 2013).

Birincil rezervuar olarak görülen hayvanlarla temas halindeki veterinerlik ve tarım çalışanları ve enfekte hayvan örnekleriyle çalışan laboratuvar personelleri meslek hastalığı olarak sayılan Q ateşi için büyük risk oluşturan gruplardır. Ayrıca gebelik, immünyetmezlik, kalp kapağı lezyonları ve vasküler anomaliler gibi bazı durumlara sahip

bireyler de kronik Q ateşi yönünden önemli risk grubu arasına girmektedir (Howe ve ark., 2009; Fournier ve ark., 2003; Nielsen ve ark., 2013; Quijada ve ark., 2012; Baud ve Greub, 2011). Risk grubu içerisinde yer alan gebe kadınlarda, semptomatik veya asemptomatik primer enfeksiyon; düşüğe, erken doğuma yada düşük ağırlıklı bebek doğumuna ve hamilelik sırasında fetüsün enfekte olmasına neden olabilmektedir (Raoult ve ark., 2002). *Coxiella burnetii* ile enfekte olan diğer memelilerde olduğu gibi hamile kadınlarda da bakteri; rahim, plasenta ve meme bezlerinde kolonize olarak çoğalmakta ve komplikasyonları daha çok gebeliğin erken evresinde daha sık görülmektedir (Langley ve ark., 2003; Carcopino ve ark., 2009). Gebelik esnasında gerçekleşen *C. burnetii* enfeksiyonu sonrası normal doğum olabileceği gibi neonatal ölüm, prematüre doğum ve düşük meydana gelebilmektedir. Ancak *C. burnetii*'nin düşük olayında nasıl bir rol aldığı hala bilinmemektedir (Rey ve ark., 2000). *Coxiella burnetii*'nin sadece, insan monositleri ve makrofajları içinde değil aynı zamanda trofoblastik hücreleri içerisinde de çoğaldığı ve plasental yetmezliğe neden olduğu bildirilmiştir (Eyigör ve ark., 2013; Quijada ve ark., 2012; Parker ve ark., 2006; Baud ve Greub, 2011). Hamile kadınlarda ve diğer memelilerde, uterus ve plasenta içerisinde kolonize olup çoğalan *Coxiella burnetii*, takip eden sonraki gebeliklerde de aktifleşerek etkisini gösterebilmektedir. *Coxiella burnetii* enfeksiyonunun doğumdan sonra kronik hale gelebildiği ve tekrarlayan düşükler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Raoult ve ark., 2005; Baud ve Greub, 2011).

Zorunlu hücre içi bakteri olan *C. burnetii*'nin klinik örneklerden veya rezervuar konaklardan izolasyonu için laboratuvar hayvanları, embriyolu tavuk yumurtası veya doku kültür hücrelerinin kullanıldığı canlı üreme ortamlarına ihtiyaç duyulmakta ve kültürasyon dönemleri uzun olduğundan başarı oranları değişken olmaktadır. *Coxiella burnetii*'nin oldukça bulaşıcı ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyonların en yaygın nedenlerinden biri olması sebebiyle organizmanın izolasyonunda genellikle 3. derece biyogüvenlik seviyesinde (BSL-3) laboratuvar uygulamaları kullanılmaktadır. Kullanılan laboratuvar uygulamalarında yer alacak hayvanların bakımı için gerekli tesislerin oluşturulmasındaki zorluklar ve enfekte hayvanların laboratuvar çalışanları için mesleki risk teşkil etmesi mikroorganizma izolasyonunda karşılaşılan diğer zorluklardır (Klee ve ark., 2006).

Komplement fiksasyonu, dolaylı immünofloresan, veya enzime bağlı immünosorbent gibi serolojik yöntemler *C. burnetii* ve neden olduğu Q ateşi hastalığının

tanısında sıklıkla kullanılan diğer laboratuvar uygulamalarıdır. Ancak *C. burnetii*'ye özgü antikorların enfeksiyondan birkaç hafta sonra ortaya çıkması ve enfeksiyondan aylar sonra tespit edilebilmesi ve dolayısıyla tanıda gecikmelerin yaşanması serolojik yöntemlerin dezavantajlarıdır (Brom ve ark., 2015; Heinzein ve Samuel, 2006). Bu dezavantajlar nedeniyle *C. burnetii*'nin kan ve doku örneklerinde araştırılmasında son yıllarda moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Giakoumelou ve ark., 2016; Howe ve ark., 2009; Fournier ve ark., 2003; Vaidya ve ark., 2008).

1.3. *Chlamydia abortus*

Chlamydia gram negatif, zorunlu hücre içi patojen olup geniş bir konak spektrumuna sahiptir (Baud ve Greub, 2011; Rohde ve ark., 2010). *Chlamydia abortus* birçok ülkede koyun, keçi ve sığırlarda düşüğe neden olan zoonotik etkenlerden biri olarak görülmekte bu hayvanların yanı sıra domuz, at, tavşan, koala ve fare gibi diğer birçok türde de düşüğe sebep olduğu bildirilmiştir (Everett ve ark., 1999; Li ve ark., 2015; Baud ve Greub, 2011). *Chlamydia abortus* enfekte koyun, keçilerde düşük veya erken doğumla ekonomik kayıplara sebep olurken, bu hayvanlarda üreme bozukluklarının önemli bir nedeni olarak görülmekte ve ayrıca gebe kadınlar için de potansiyel bir risk teşkil etmektedir (Rodolakis ve Mohamad, 2010; Rohde ve ark., 2010; Berri ve ark., 2009). Hamile kadınlarda ateş, baş ağrısı, halsizlik, bulantı ve kusma enfeksiyonun ilk belirtileridir ve devamında sıklıkla alt karın ağrısı ve ardından düşük ve diğer ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir (Rodolakis ve Mohamad, 2010).

İlk olarak 1967'de Roberts ve arkadaşları tarafından tanımlanıp, bugüne kadar bildirilen *C. abortus* insan enfeksiyon vakalarının çoğunda enfeksiyonun anne ve fetus üzerinde yüksek risk taşıdığı bildirilmiştir (Meijer ve ark., 2004). *Chlamydia abortus* plasenta dokusu için yüksek afiniteye sahip olup plasental trofoblastlarda etkili bir şekilde kolonize olmaktadır (Berri ve ark., 2009; Li ve ark., 2015). Enfeksiyona bağlı düşüklerin genellikle klinik bulguların başlamasından hemen sonra ortaya çıktığı ve gebeliğin 14. ve 36. haftaları arasında gerçekleştiği bildirilmiştir. Enfekte koyun ve keçilere maruz kalmış gebe kadınlarda kendiliğinden düşükler ve potansiyel ölümcül sistemik enfeksiyonların geliştiği de bildirilmiştir (Rohde ve ark., 2010). Dolayısıyla gebeliğin her aşamasında *C. abortus* enfeksiyonları kadınlar için risk oluşturduğundan, gebelik döneminde koyun veya keçi ile temastan kaçınmaları gerektiği belirtilmiştir (Li ve ark., 2015).

Gebelik komplikasyonları olan bir kadın, tarımla uğraşmış veya tıbbi geçmişinde gebe hayvanlarla temas etmişse *C. abortus* yönünden ayırt edici bir tanımlamanın yapılması gerekmektedir. Klamidyal zoonoz patojenlerinin duyarlı ve türe özgü standardize edilmiş test veya testlere dayalı bir teşhis prosedürü bulunmadığından laboratuvar testleri insan ve hayvanlar için tatmin edici olmamakta ve patojen tespiti uzmanlaşmış/araştırma laboratuvarı düzeyinde sınırlı kalmaktadır (Rohde ve ark., 2010). *Chlamydia* 'lar zorunlu hücre içi paraziti olmaları nedeniyle konak hücre dışında replike olamazlar. Etiyolojik tanı, embriyolu tavuk yumurtası üzerinde yapılan testlerle belirlenmektedir. Ancak bu işlemlerin yoğun ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin teşhisler veya büyük ölçekli epidemiyolojik araştırmalar açısından uygun olmamaktadır. Daha hassas ve spesifik teşhis için moleküler yöntemlere başvurulmaktadır (Li ve ark., 2015).

1.4. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, listeriyoz vakaları ve salgınlarından sorumlu olan gram pozitif, fakültatif, hücre içi, gıda kaynaklı bir patojendir (Mateus ve ark., 2013; Baud ve Greub, 2011). Pek çok hayvan türünü özellikle geviş getirenleri enfekte edebilmektedir. Doğada yaygın olarak görülmesiyle birlikte, silaj, kanalizasyon, toprak, sağlıklı insanlar ve hayvanların dışkılarından da izole edilmiştir (Baud ve Greub, 2011). İlk insan listeriosis vakaları ise 1929'da Nyfeldt tarafından bildirilmiştir, 1980'lerde kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu birçok ülkede salgınların ortaya çıkmasına neden olan *Listeria monocytogenes* gıda kaynaklı bir patojen olarak tanınmıştır. Bu nedenle *L. monocytogenes* halk sağlığı sorunlarının başlıca kaynağı olarak görülmeye başlanmıştır (Shetty ve ark., 2009; Mateus ve ark., 2013; Mazza ve ark., 2015). *Listeria monocytogenes* geniş pH aralığı, yüksek tuz konsantrasyonları ve düşük sıcaklık gibi zorlu koşullarda canlılık ve gelişme yeteneğini koruduğu için gıda endüstrisi yönünden büyük bir tehdit oluşturmaktadır.

Birçok araştırmacının, et, süt, balık ürünleri, dondurma ve sebze gibi çeşitli yiyeceklerden *L. monocytogenes*'i izole etmesi ile birlikte insanlarda *Listeria* enfeksiyonlarının %99'unun gıda kaynaklı olduğu ortaya konulmuştur (Mateus ve ark., 2013; Wiedmann, 2003). Yenidoğan bebekler, 60 yaş üstü yetişkinler, immün sistemi

baskılanmış hastalar ve gebe kadınlar arasında enfeksiyon oranı yüksek olmaktadır (Mateus ve ark., 2013; Hage ve ark., 2014).

Listeria monocytogenes; klinik olarak spesifik olmayan gastroenterit ve influenza benzeri semptomlarla veya asemptomatik olarak kendini göstermektedir. Ayrıca menenjit, ensefalit, sepsisemi, endokardit gibi hastalıkların yanı sıra düşük, erken doğum veya ölü doğum gibi gebelik komplikasyonlarına sebep olmaktadır (Mook ve ark., 2010; Baud ve Greub, 2011; Lamont ve ark., 2011). Hastalık geliştirme riski oldukça yüksek olan gebelerde, progesteron seviyesinin artması hücresel bağışıklığı minimum düzeye indirerek hücre içi mikroorganizmalara duyarlı hale getirmektedir (Ogunmodede ve ark., 2005; Leber ve ark., 2011). Uterus ve plasentaya yönelim göstermesiyle bilinen *L. monocytogenes*'e karşı duyarlılığın hamileliğin ileri dönemlerinde fazla olduğu bildirilmiştir (Mateus ve ark., 2013; Ogunmodede ve ark., 2005).

Ayrıca gebelerde sıklıkla reçete edilen antasit veya demir takviyelerinin midenin alkali hale gelmesine zemin hazırlamasıyla enfeksiyonu teşvik ettiği bildirilmiştir. *Listeria*'nın bağırsak mukozal bariyerini geçip, fetoplasental üniteyi enfekte etme eğilimi yüksektir. Enfeksiyon sonrası fetüste ölümler görülebilmekte ve %30'un üzerindeki enfeksiyonlarda düşüğün, ölü doğumun, erken doğumun, korioamniyonitin, anne ve yenidoğan sepsisinin görüldüğü belirtilmiştir (Baud ve Greub, 2011; Lamont ve ark., 2011; Bortolussi, 2008; Jackson ve ark., 2010).

Teşhiste gram boyama, hareketlilik, katalaz ve asit üretimi gibi biyokimyasal reaksiyonları içeren klasik testler kullanılmaktadır (Khelef ve ark., 2006). Bu testlerin yanı sıra serum aglütinasyon, komplement fiksasyon testi ve ELISA gibi serolojik testler tercih edilebilecek yöntemler olsalar da, *L. monocytogenes* ile diğer gram pozitif bakteriler arasındaki antijenik çapraz reaktivite bu yöntemlerin tanı için kullanımlarını kısıtlamaktadır (Khelef ve ark., 2006; Akça ve Şahin, 2011; Allerberger, 2003). Mikrobiyolojik tanı tekniklerinin uygulanmadaki zorlukları ve plasentadaki diğer hastalıklarla karıştırılması kesin bir değerlendirmeyi engellediğinden *L. monocytogenes* enfeksiyonunun hamilelikte sıklıkla teşhis edilemediği bildirilmiştir (Mateus ve ark., 2013).

Listeria monocytogenes suşlarının virülansı hastalığın gelişiminde önemli bir belirleyicidir. Virülans potansiyeli genetik faktörlere bağlıdır ve bu faktörlerin belirlenmesinde PZR gibi moleküler yöntemler sağladığı avantajlar nedeniyle tercih

edilmektedir. PZR tekniğinin son zamanlardaki epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması listeriosis salgınlarının hızlı bir şekilde izlenmesine ve *L. monocytogenes* suşları arasındaki virülans farklılıkların belirlenmesine olanak sağlamaktadır. PZR gibi geliştirilmiş moleküler temelli araçlar sayesinde hamilelik sırasında yüksek oranda ajan tespit edilebilmekte dolayısıyla hücre içi mikroorganizmaların patogenezi hakkında daha geniş bilgi elde edilmektedir (Baud ve Greub, 2011).

Tez kapsamında hayvanların yanı sıra kadınlarda da düşüğe sebep olabilen zoonotik bakterilerden *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* ve *Listeria monocytogenes*'in daha hızlı, hassas ve spesifik teşhisine olanak sağlayacak simpleks/multipleks PZR protokolleri oluşturulması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Literatür araştırmaları sonucunda kadınlarda düşüğe neden olan zoonotik bakteri/bakterilerin simpleks/multipleks PZR ile belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda kaynağa ulaşılmıştır. Tez kapsamına dahil edilen *B. abortus*, *C. burnetii*, *C. abortus* ve *L. monocytogenes*'in PZR (simpleks ve/veya multipleks) ile identifikasyonu içerikli çalışmalara ise çok daha az sayıda rastlanılmıştır.

Brucella türlerinin doğal konaklarında, düşüğe neden olduğuna dair çalışmalar olmasına rağmen insanda düşüğe neden olduğuna dair kesin kanıtlar bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra kadınlarda görülen gebelik komplikasyonlarının *Brucella* kaynaklı olabileceği rapor edilmiş ve bazı düşük vakalarında; fetüs veya plasenta dokularından *Brucella* türleri izole edildiği bildirilmiştir (Khan ve ark., 2001, Karcaaltıncaba ve ark.,2010; Giakoumelou ve ark., 2016).

Morrell ve arkadaşları (2019), Arjantin'de yaptıkları bir çalışmada spontan düşük yapan 150 sığırlardan alınan klinik örneklerde *IS711* geni üzerinden *Brucella abortus* tespitine yönelik PZR çalışması yapmış, örneklerin yaklaşık %7'sinin pozitif olduğunu rapor etmişlerdir. Garshasbi ve arkadaşları (2014), İran'da bruselloz risk oranı yüksek bireylere ait serum örnekleriyle yapmış oldukları çalışmada PZR ile geleneksel tanı yöntemlerini karşılaştırmışlardır. *Brucella* türlerinin PZR ile identifikasyonu için *BCSP31* ve *IS711* bölgeleri çalışılmış olup, identifikasyonda PZR yönteminin hassasiyetinin %96, spesifitesinin %80.7 olduğu ve türe özgü hassasiyet düzeyinin ise %82 olduğu bildirilmiştir. Bruselloz şüphesi olan hastaların dahil edildiği diğer bir çalışmada alınan kan örneklerinde *BCSP31* geni üzerinden yapılan PZR çalışması ile *Brucella* spp. tespit edilmiş, pozitif çıkan örnekler *IS711* geni yönünden taranarak *Brucella abortus* identifikasyonu sağlanmıştır (Elfaki ve ark., 2005). Probert ve arkadaşları (2004) *IS711* genine spesifik primerler ile real-time PZR çalışmaları yapmış, *B. abortus* için PZR hassasiyetinin %92 ve spesifitesinin ise %100 olduğunu belirtmişlerdir.

Bruselloz şüphesi bulunan hastalardan alınan 52 kan örneğinden mPZR ile identifikasyonu amacıyla *IS711* gen bölgesinin dahil olduğu iki gen üzerinden primer tasarımları yapılmış ve belirli primerlerle *Brucella abortus* ile beraber üç majör türün aynı anda tanımlanabildiği bildirilmiştir. Kan örneklerinin alındığı hastaların birçoğunun hayvancılıkla ilgilendiği bildirilmiş olup %48'inde pozitif, %23'ünde negatif sonuç elde

edilmiştir. Çalışma sonucunda mPZR'nin tür tespitinde eş zamanlı, basit, hızlı ve nispeten ucuz bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Mirnejad ve ark., (2013). Ali ve arkadaşları (2015) koyun ve keçilerden alınan serum ve süt örneklerinden *Brucella abortus* tespitine yönelik yaptıkları çalışmada seropozitif olarak tespit edilen örnekleri moleküler olarak değerlendirmiş, IS711 gen bölgesine spesifik primerler ile yapılan PZR çalışmasında örneklerin %75'inin pozitif olduğunu rapor etmişlerdir.

İnsan ve hayvanlardan alınan kan ve süt örneklerinde *omp2* gen bölgesi üzerinden *Brucella* spp. identifikasyonuna yönelik yapılan çalışmada PZR yönteminin hassasiyeti vurgulanmıştır (Leal-Klevazas ve ark., 1995). Yine aynı şekilde Imaoka ve arkadaşları (2007) *omp2b* gen bölgesi üzerinden PZR çalışması ile *Brucella abortus*'un identifiye edilebileceğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada *omp2* gen bölgesinin yanı sıra BCSP31 ve 16S rRNA üzerinden gerçekleştirilen PZR çalışması ile insan ve hayvanlardan alınan klinik örneklerde Bruselloz teşhisi sağlanmıştır (Zamanian ve ark., 2015). Satei ve arkadaşları (2020), İran'da yaptıkları bir çalışmada BCSP31 gen bölgesine spesifik primerler kullanarak koyun ve ineklerden alınmış süt örneklerinden *Brucella abortus*'un identifiye edildiğini bildirmişlerdir.

İran'da yaptıkları başka bir çalışmada ise Mirnejad ve arkadaşları (2017) şüpheli insan ve hayvan vakalarından alınan örneklerle *Brucella* tespiti için biyokimyasal ve mikrobiyolojik testler uygulanmıştır. Testler sonucunda 100 örneğin 78'inde *Brucella* spp. tespit edilmiş ve *Brucella* spp. tespit edilen örnekler ayrıca spesifik primerler kullanarak mPZR ile de çalışılmıştır. PZR sonucuna göre 78 örneğin 57 (%71)'sinin *Brucella melitensis*, 21 (%27)'inin *Brucella abortus* olduğu rapor edilmiştir. PZR ile identifikasyonu amacıyla *Brucella* patogeneğinde önemli bir yere sahip olduğu düşünülen *ure* (%74.4), *wbkA* (%89.7), *omp19* (%93.6), *mviN* (%94.9), *manA* (%100) ve *perA* (%92.3) virülans genleri çalışılmıştır.

Queipo-Ortuño ve arkadaşları (1997), 47 hastadan aldıkları 50 kan örneğinde PZR ile bruselloze yönelik hızlı tanıyı amaçlayan bir çalışma yapmış, BCSP31 bölgesinin amplifikasyonu için türe özgü primerler kullanmışlardır. Onbeş örneğin serolojik testlerle, 35 örneğin ise kan kültürü ile *Brucella abortus* pozitif olduğu belirlenirken, PZR ile de tüm örneklerin *Brucella abortus* yönünden pozitif olduğu doğrulanmıştır. PZR testi hassasiyetinin %100, spesifitesinin ise %98.3 olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, PZR çalışmasının *Brucella* türlerinin tespiti için hızlı ve kolay

uygulanabilen bir yöntem olmasının yanı sıra laboratuvar personeli için risk oluşturmaması yönünden de uygunluk derecesinin yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

Literatürde düşük etmeni olarak *Coxiella* cinsine ait türler ile ilgili oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Gebeliğin erken evrelerinde gelişen *C. burnetii* enfeksiyonunun daha sık komplikasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Carcopino ve ark., 2009). Eyigör ve arkadaşları (2013), düşük yapmış (36), normal doğum yapmış (22) kadından alınan kan ve plasenta örnekleri ile düşük yapan kadınların eşlerinden (31) alınan kan örneklerinde *C. burnetii* identifikasyonu amacıyla serolojik testler ve PZR çalışmaları yapmışlardır. PZR çalışmasıyla *IS1111* bölgesindeki tekrarlayıcı diziler belirlenmiştir ve buna göre çalışılan 89 örneğin tümünde *C. burnetii*'ye rastlanılmadığı belirtilmiştir. Gebelik sırasında geçirilen *C. burnetii* enfeksiyonu ile normal doğum görülebildiği gibi, düşüklerinde görülebildiği bildirilmiştir (Eyigör ve ark., 2013).

Vaidya ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada spontan düşük yapan 74 kadından alınan 368 örnekte *C. burnetii* identifikasyonu amacıyla PZR ve serolojik çalışmalar yapılmıştır. Real-time PZR ve trans-PZR analizlerinde tekrarlayan transpozon bölgesi *IS1111* çalışılmıştır. Moleküler ve serolojik çalışmalar sonucunda 74 hastanın 19'unda (%25.68) yalnızca serolojik testler de pozitif sonuç alınırken, 16'sında her iki test sonucunda (%21.62) pozitif sonuca ulaşıldığı rapor edilmiştir.

Cezayir'de yapılan başka bir çalışmada spontan düşük yapmış 380 kadının ve kontrol grubu olarak normal doğum yapmış 345 kadının serum ve plasenta örneklerinde *C. burnetii* varlığı serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. PZR çalışmalarında *IS1111* ve *IS30a* gen bölgelerinin hedef alınmıştır. Serolojik testlerle spontan düşük yapan 380 kadından 4'ünde antikor tespit edilirken, PZR analizlerinde 4 plasental örneğinin *C. burnetii* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Ghaoui ve ark., 2018). Klaasen ve arkadaşları (2014), koyun ve keçilerden alınan serum ve süt örneklerinden *IS1111a* bölgesi üzerinden yapılan PZR ile *C. burnetii* identifikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Sığırlardan alınan plasenta örneklerinde *IS1111a* ve *icd* gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, örneklerin *C. burnetii* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Hansen ve ark., 2011). Günaydın ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları çalışmada sığır, koyun ve keçilerdeki düşük sonrası fetüsten alınan örneklerde *IS1111* geni üzerinden *C. burnetii* varlığı araştırılmış, ruminantlarda düşüklerin *C. burnetii* ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada

ise koyun ve keçi sürüleri içerisinde düşük geçmişi olan ve olmayan hayvanlardan toplanan süt örneklerinde PZR ile *IS1111* geni taranmış ve çalışma sonucunda her iki örnek grubunda pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Kılıç, 2017).

Düşük yapan koyun, keçi ve sığırların fetüs örnekleri ile yapılan çalışmada *com1* gen bölgesi üzerinde *C. burnetii* identifikasyonunu gerçekleştiren araştırmacılar PZR'nin hızlı ve güvenilir bir teknik olduğunu belirtmişlerdir (Gürbilek ve ark., 2018). Zhang ve arkadaşları (1998) ise insan serum örneklerinden *com1* geni üzerinden yapılan PZR çalışması ile *C. burnetii* identifikasyonu sağladıklarını bildirmişlerdir. Çin'de yapılan bir çalışmada insan ve hayvanlardan alınan kan ve süt örneklerinde PZR ile *com1* gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak *C. burnetii* taraması yapılmış, kan örnekleri hariç süt örneklerinde *C. burnetii* pozitifliği rapor edilmiştir (El-Mahallawy ve ark., 2016). Marushchak ve arkadaşları (2020) *com1* geni üzerinden CoxF2 ve CoxR4 primer çiftini kullanarak yaptıkları optimizasyon çalışmasında, *C. burnetii* teşhisinde PZR yönteminin hassas olduğu belirtmişlerdir.

Koyun ve keçi sürülerinde doğum ve düşük sonrası alınan klinik örnekler *C. abortus* ve *C. burnetii* tanısı yönünden taranmıştır. 253 klinik örnekte *C. abortus* ve *C. burnetii* türlerini aynı anda tanımlamak için *pmp90/91* ve *IS1111a* gen bölgeleri multipleks PZR ile çalışılmış ve örneklerin 16'sının *C. abortus* ve 49'unun *C. burnetii* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Örneklerden 2'sinin ise mPZR sonucuna göre hem *C. abortus* hem *C. burnetii* yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar mPZR gibi moleküler yöntemlerin, klinik tanı laboratuvarında, aynı anda birden fazla patojeni tespit etmek için avantajlı olduğunu, iki etkenin aynı anda hızlı ve düşük maliyetle tespiti ile tanıda kolaylık sağlanacağını, ek olarak tanı tekniklerindeki iyileşme ile mikroorganizmanın patogeneğinde ve prevalansında daha geniş bilgilerin edinilmesine imkân oluşturacağı vurgulanmıştır (Berri ve ark., 2009).

İneklerde düşüğe neden olan *Chlamydia* enfeksiyonlarının insanlarda da düşüğe neden olabileceği belirtilmektedir ve tanı amacıyla çoğunlukla serolojik testler kullanılmaktadır. Hamilelerde 13 haftadan önce gerçekleşen düşüklerin yaklaşık %15'inin, sonraki haftalarda gerçekleşen düşüklerin %60'ının ve erken doğumların %40'ının *Chlamydia* enfeksiyonlarıyla ilgili olabileceği bildirilmiştir (Reid ve ark., 2017). Düşük vakalarında ajan olarak *Chlamydia* tanısında PZR kullanımına yönelik sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Kılıç ve arkadaşları da (2010) *ompA* gen bölgesini hedef alan primerler kullanarak düşük yapan sığır fetüsünde *Chlamydia abortus* teşhisi yapmışlardır. Düşük vakalarının görüldüğü koyun sürülerinden aldıkları örneklerle *Chlamydia abortus*'a ait *ompA* ve *pmp* gen bölgeleri üzerinden yapılan çalışmada PZR duyarlılığı test edilmiş, *pmp* gen familyası ile diğer *Chlamydia* türleri yönünden amplifikasyon görülmediği bildirilmiştir (Laroucau ve ark., 2001). Ababneh ve arkadaşları (2014) koyun ve keçilerden aldıkları plasental doku ve vajinal swap örneklerinde *omp2* gen bölgesi üzerinden yaptıkları çalışmada *Chlamydia abortus* identifikasyonu sağlamış ve *C. abortus*'un koyun ve keçilerde düşüğe neden olduğunu bildirmişlerdir.

Düşük vakalarının bulunduğu keçi sürülerinden alınan doku örneklerinde serolojik ve moleküler yöntemlerle kullanılarak *C. abortus* varlığı araştırılmış, *pmp 90/91* gen bölgesi üzerinden yapılan PZR çalışmasında *C. abortus* identifiye edilmiştir (Campos-Hernández ve ark., 2014). Li ve arkadaşları (2015) gebe ineklerden alınan vajinal sürüntü ve fetüs örneklerinde *C. abortus* identifikasyonu için PZR ile *pmp* gen bölgesini çalışmışlardır. 126 vajinal sürüntüsünün 30'unda (%23.81) *C. abortus* ve 9 adet fetüs örneğinin tamamında sonucun pozitif olduğu bildirilmiştir. PZR ile elde edilen sonuçlar ile *Chlamydia abortus* enfeksiyonunun sürüde karşılaşılan düşüklerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Düşük yapan koyunlardan alınan vajinal swap örnekleri ile yapılan diğer bir çalışmada PZR ve serolojik yöntemlerle *Chlamydia abortus* varlığı araştırılmış ve PZR'nin kullanışlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Güler ve ark., 2006).

Meijer ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları bir çalışmada dolaylı yoldan *C. abortus*'a maruz kalmış ve ölü doğum vakası bildirilmiş 25 haftalık hamile bir kadında yapılan kan kültürü sonucunun negatif olduğu ancak doğrulama için yapılan PZR analizinde ise *Chlamydia abortus* tespit edildiği belirtilmiştir. PZR çalışmasında 16S rRNA bölgesinin 219 bp'lik kısmı amplifiye edilmiştir. Çalışma kırsal alanda yaşayan, küçükbaş hayvanlarla temas halinde olan hamile kadınların zoonotik hastalık riski taşıdıkları belirtilmiştir. Ruminantlarda düşüğe neden olduğu bilinen bakterilerden *Chlamydia abortus* tanısı için düşük yapan koyun ve keçilerden alınmış 252 adet doku örneğiyle yapılan çalışmada 16S rRNA ve 16S-23S aralayıcı rRNA gen bölgeleri bir PZR türü olan Touch Down Enzyme Time Release PZR (TETR-PCR) tekniğiyle çalışılmıştır. Çalışmada PZR sonuçları hücre kültürü sonuçlarıyla da karşılaştırılmıştır. 252 doku örneğinin 56'sında (%22.2) hücre kültürü ve 65'inde (%25.8) TETR-PCR ile pozitif

sonuç alındığı bildirilmiştir. Hücre kültürü pozitif olan 56 örneğin 54'ünün (%96.4) ise PZR çalışması ile pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda PZR'nin %97 hassasiyet ve %99.5 spesifiteye sahip olduğu, hücre kültürü çalışmalarının ise %84.8 hassasiyet ve %100 spesifiteye sahip olduğu bildirilmiştir. *Chlamydia abortus* tanısında PZR'nin enfekte doku örneklerinin çalışılması için kullanılabilecek pratik, hızlı, duyarlı ve spesifik bir yöntem olduğu belirtmiştir (Amin, 2003).

Arıf ve arkadaşları (2020) Kuzey Irak'da düşük vakalarının bulunduğu koyun sürüsünden düşükle sonuçlanmış 30 fetüs örneğinde geleneksel PZR ve dizileme çalışması ile *C. abortus* ve *B. abortus* teşhisi yapmışlardır. *Chlamydia abortus*'ta *ompA* geni ve diğer türde *BCSP31* genleri PZR ile çoğaltılmıştır. Çalışma sonucunda bir örnekte *C. abortus*, 29 örnekte ise *B. abortus* identifikasyonu yapılmıştır.

Listeria monocytogenes yaygın gıda kaynaklı bir patojen olmasının yanı sıra plasentayı geçebilen sınırlı bakteriden biri olup fetüs ve yeni doğanı negatif etkilemektedir. Hamile kadınlarda düşüklere, ölü veya erken doğumlara ayrıca yeni doğan ünitelerinde ve transplantasyon merkezlerinde salgınlara neden olduğu bildirilmiştir (Kiss ve ark., 2006; Cengiz, 1999). Düşük kaynaklı araştırmalarda *L. monocytogenes*'in moleküler veya diğer tekniklerle tanımlanmasına yönelik az sayıda çalışma bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan bir araştırmada 250 süt numunesi kültürel olarak değerlendirilmiş, yapılan izolasyon ve identifikasyonu çalışmaları sonucunda örneklerin sadece 2 adedinde *Listeria monocytogenes* tespit edilmiştir. Sütlerinden enfeksiyon etkeni izole edilen ineklerin her ikisinde de düşük meydana geldiği bunların yanı sıra düşük yapan 96 inekten alınan vajinal swap örneklerinin 5 adedinde *L. monocytogenes* varlığı bildirilmiştir (Akça ve Şahin, 2011).

Jamshidi ve arkadaşları (2009), spontan düşük yapan 250 kadın ve kontrol grubu olarak normal doğum yapan 200 kadından alınmış serum örneklerinden immüno Floresan antikor testi ile *L. monocytogenes* antikorunu belirlemişlerdir. Düşük olgularının 84'ü (%35.6) ve kontrol grubunun 35'i (%17.5) *L. monocytogenes* antikorunu yönünden pozitif bulunmuştur.

Süt örneklerinde *L. monocytogenes* ve *Listeria innocua* identifikasyonu ve sayısının belirlenmesi üzerine real time qPCR çalışmasında *iap* genine ait iki farklı uzunluktaki

bölgenin kullanıldığı çalışmada real time qPZR'nin organizmaların direkt saptanması yönünde duyarlı olduğu bildirilmiştir (Hein ve ark., 2001).

Hamile kadınlardan alınan vajinal swap örnekleri biyokimyasal analizlerle *L. monocytogenes* varlığı açısından değerlendirilmiş, pozitif bulunan örneklerde PZR çalışması ile *hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlC*, *inlJ* ve *prfA* virülans genlerinin varlığı araştırılmıştır. Taranan örneklerde *L. monocytogenes hlyA* geni tespit edilmiştir (Heidarzadeh ve ark., 2018). Kaur ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada spontan düşük yapan 61 kadından alınan kan, idrar, plasenta, dışkı, vajinal sürüntü örneklerinden oluşan toplam 305 numune biyokimyasal testlerle analiz edilmiş ve 9 (%14.8) kadından alınan 10 örnekte *Listeria* spp. olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın devamında *Listeria* izolatlarında virülans ile ilişkili genlerin (*prfA*, *plcA*, *hlyA*, *actA* ve *iap*) varlığı mPZR ile belirlenmiştir. Sonuçta izolatlardan iki adedinin patojenik suş olduğu ve beş virülans genine sahip olduğu rapor edilmiştir. *plcA* geninin ekspresyonunun, patojenik *Listeria* spp.'de başlıca virülans markırı olarak önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir.

Hamile kadınlardan alınan 3700 klinik örneğin *Listeria* spp. izolatında virülans özelliklerini kodlayan *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *prfA*, *actA*, *hlyA* ve *iap* gen bölgeleri çalışılmış, 30 (%0.81) örnek pozitif olarak bildirilmiştir. Onikisi plasental, 18'i vajinal swaplardan olan pozitif örneklerin söz konusu genlerin tamamını içerdiği bulunmuştur. Çalışma ile epidemiyolojik araştırmalarda insanlardan alınan klinik örneklerde ön koşul olarak patojeni izole ve karakterize etmenin önemi belirtilmiştir (Soni ve ark., 2015). Le Monnier ve arkadaşları (2011) Listeriyoz şüphesi olan hastalardan alınan beyin omurilik sıvısında *hly* gen bölgesinin amplifikasyonu ile *L. monocytogenes* varlığı belirlemiş ve PZR'nin hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Lübnan'da gıda örneklerinden *L. monocytogenes* varlığını belirlemek amacıyla *hly*, *actA* ve *inlB* virülans genleri üzerinden PZR çalışması yapılmış, örneklerin %100'ünde *hly* ve *actA* genleri tespit edilmiştir (Haidar-Ahmad ve ark., 2016). De la Rosa Zariñana ve arkadaşları (2017) tavuk, sığır ve domuz etinde *L. monocytogenes* saptanmasının PZR standardizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada *iap* geni ve spesifik primerler kullanmışlardır. PZR tekniğinin standart mikrobiyolojik teknikten çok daha hassas ve spesifik olduğu bildirilmiştir. Sığır etlerinde *L. monocytogenes* varlığının *iap* geni üzerinden PZR yöntemi ile araştırıldığı çalışmada örneklerin yaklaşık %28'inin *Listeria monocytogenes* varlığı yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Lozano ve ark., 2013).

Barkallah ve arkadaşları (2016) ruminantlarda düşüğe neden olan *L. monocytogenes* ve *Waddlia chondrophila*'nın sırasıyla *hly* ve 16S rRNA bölgeleri üzerinden spesifik primerler ile dublex PZR çalışması yapmış, etkenlerin aynı anda tespitininin sağlandığı çalışmada sonuçların %100 spesifite ve hassasiyete sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar mPZR'nin mikroorganizmaların eşzamanlı ve hızlı tespitinde önemli bir yere sahip olduğunu bildirmişlerdir. İran'da yapılan bir çalışmada düşük yapan kadınlardan alınan toplam 125 kan, serum, idrar, vajinal swap örnekleri, 267 gıda örneği ile 50 çiftlik hayvanından alınan örneklerde *L. monocytogenes* varlığı ve antimikrobiyal duyarlılığı incelenmiştir. *plcA* gen bölgesi hedef alınarak yapılan mPZR analizlerinde 125 insan örneğinin %8.8'inde, 267 gıda örneğinin %2.99'unda ve çiftlik hayvanlarından alınan 50 numunenin %6'sında *L. monocytogenes* varlığı tespit edilmiştir (Lotfollahi ve ark., 2017). Razei ve arkadaşları (2017) gıda örneklerinde toksin üretici türler olan *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Campylobacter jejuni*'nin belirlenmesi amacıyla multipleks PZR çalışması yapmışlardır. *Listeria monocytogenes*'te *hly* genine ait 300 bp uzunluğundaki bölge ile diğer organizmaların genlerine ait bölgelerin mPZR ile çoğaltılabildiği ve her bir gen bölgesine ait primerlerin spesifik olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile gıda analizlerinde mPZR uygulamasının hız ve maliyet açısından avantajlı olduğu belirtilmiştir. McDonald ve arkadaşları (2001) *Coxiella burnetii*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* ve *Brucella melitensis*'in dört primer çifti kullanılarak mPZR ile tespitine yönelik çalışma yapmış, araştırmacılar bu etkenlerin aynı anda tespitine yönelik ilk çalışma olduğunu bildirmişlerdir. Sığırlarda düşüğe neden olan mikroorganizmaların tespiti amacıyla klinik örnekler üzerinden mPZR çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada *Brucella* spp. *omp* geni, *Listeria monocytogenes* *hlyA* geni, *Mycoplasma* spp. 16S rRNA geni ve *Leptospira* *lig* genine ait dört spesifik primer çifti kullanılarak mPZR ile bu suşların identifikasyonu yapılmıştır (El-Sayed ve ark., 2019). Sareyyüpoğlu ve Cantekin (2009) *Chlamydophila psittaci* (*pmp*) ve *Salmonella* spp. (*iroB*)'nin aynı anda tespitine yönelik mPZR tasarlamış, jel elektroforezinde her iki gen bölgesine ait spesifik bantların varlığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada; PZR test tüpleri Labcon (ABD), pipet uçları Axygen (ABD), agaroz Sigma Aldrich (Almanya), 10x TBE tamponu (10X) Snp Biyoteknoloji (Türkiye), safe red nükleit asit boyası Bioshop (Kanada), PZR tamponu (10X), taq polimeraz, MgCl₂, yükleme boyası ve DNA ladder (100 bp) Thermo Fischer Scientific (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Bununla birlikte otomatik pipet (Eppendorf Research, Almanya), termal ısı döngü cihazı (Labnet Multigene, ABD), elektroforez ünitesi (Wealtec Bioscience, ABD), jel görüntüleme cihazı (BioRad, ABD), saf su cihazı (MerckMillipore Elix®, ABD), vorteks (Velp, İtalya), hassas terazi (Ohaus, ABD), buz makinası (Scotsman, İtalya), otoklav (Alp, Japonya) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteriyel DNA

Bakteriyel DNA'lar Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. DNA miktarları spektrofotometrik (Nanodrop Merinton, SMA 1000, Çin) olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Primer Dizaynı ve Seçimi

Brucella abortus, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Listeria monocytogenes*'e ait simpleks/multipleks PZR tabanlı kalitatif analizlerinin yapılması amacıyla primer dizaynı için her bir organizmaya ait 2'şer gen bölgesi çalışma kapsamına alınmıştır (Çizelge 3.1).

Brucella abortus için *IS711* ve *omp2b*, *Coxiella burnetii* için *com1* ve *IS1111a*, *Chlamydia abortus* için *ompA* ve *pmp 90/91*, *Listeria monocytogenes* için *hly* ve *iap* genlerine ait bölgeler çalışılmıştır (Mancilla ve ark., 2011; Fitch ve ark., 1989; Pishva ve ark., 2015; Zhang ve ark., 1997; Lockhart ve ark., 2011; Klee ve ark., 2006; Oskam ve ark., 2017; Pantchev ve ark., 2010; Heidari ve ark., 2018; Volokhov ve ark., 2002; Le Monnier ve ark., 2011; Bubert ve ark., 1999).

Suşlara ait genlerde 165-588 bp büyüklüğündeki bölgelerin amplifikasyonları hedeflenmiştir.

Çizelge 3.1. *B. abortus*, *C. burnetii*, *C. abortus*, *L. monocytogenes*'e ait gen bölgeleri ve GenBank erişim numaraları

Organizma	Gen	GenBank erişim numarası
<i>Brucella abortus</i>	<i>IS711</i>	M94960.1
	<i>omp2b</i>	KP087921.1
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>com 1</i>	MG874798.1
	<i>IS1111a</i>	M80806.1
<i>Chlamydia abortus</i>	<i>ompA</i>	MH542161.1
	<i>pmp 90/91</i>	U65942.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	MG922920.1
	<i>iap</i>	JF967603.1

Primer dizaynları, National Center for Biotechnology Information (NCBI) web sayfasındaki ücretsiz çevrimiçi primer dizayn platformu Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1-3.8) (Ye ve ark., 2012). BLAST algoritması yoluyla, tasarımları yapılan primer çiftlerinin seçiminde;

- multipleks PZR'de de etkin bir şekilde kullanılabilirliğini sağlamak için, birbirine yakın erime sıcaklığı (T_m) değerlerine sahip olmaları,
- primer hassasiyetinin korunması amacıyla uzunlukları,
- bağlanma afinitesinin yükseltilmesi amacıyla dengeli bir G/C yüzdesine sahip baz kompozisyonunun bulundurmaları,
- primer-dimeri ve saç tokası (hairpin) oluşturmayacak baz dizilimine sahip olmaları,
- primer çiftlerinin birbirleri ile uyumları göz önüne alınmıştır.

Hedef bölge uzunluğunun farklı olması kısa parçaların uzun bölgelerde çoğalmasına dolayısıyla ürünlerde farklılıklar yaratmasına neden olacağından, başarılı bir reaksiyon amacıyla çoğaltılan ürünlerin benzer uzunlukta olmasına ve primerlerin benzer

bağlanma sıcaklıklarına sahip olmasına dikkat edilmiştir. Tüm bu verilenlerden yola çıkılarak her bir gen bölgesi için 6-10 arasında primer çifti dizayn edilmiştir ve tasarlanan potansiyel primer çiftleri arasından Tm değerlerine ve G/C oranlarına bakılarak seçim yapılmıştır. En uygun primer uzunluğuna sahip olmasının yanı sıra nükleotid tekrarlarının bulunmamasına da dikkat edilmiştir. Primer-BLAST programından alınan detaylı raporda kendi kendine bağlanma olasılığı düşük olanlar seçilerek primerin kendi kendine bağlanma olasılığı minimuma indirilmiştir. Yine aynı raporda primerlerin 3' ucundaki diğer primere bağlanma olasılığı dikkate alınarak, primer dimerlerinin oluşmasının engellenmesi amacıyla 3' bağlanma oranları düşük olanlar tercih edilmiştir (Şekil 3.1-3.8). Primer-BLAST program sonuçlarına göre seçilerek dizayn edilen primer çiftleri sentezlettirilmiştir (Sentegen, Türkiye).

Brucella abortus - IS711

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Primer Pair 1							
Forward Primer	CCTTCGGCAAATGGACAG	234	18	60.19	55.56	3.00	1.00
Reverse Primer	CGATTGTTGGGACACTGGA	679	19	60.52	52.63	3.00	0.00
Product size	446						
Primer Pair 2							
Forward Primer	CTGCGAATAAAGCCAACACC	481	20	60.64	50.00	2.00	0.00
Reverse Primer	TGAATGCGGTCAATGTTTT	784	20	59.52	40.00	4.00	1.00
Product size	304						
Primer Pair 3							
Forward Primer	CTGCGAATAAAGCCAACACC	481	20	60.64	50.00	2.00	0.00
Reverse Primer	CATGAATGCGGTCAATGTTT	786	20	59.40	40.00	4.00	1.00
Product size	306						
Primer Pair 4							
Forward Primer	ACGGCTCAGATCAAGGTCAA	631	20	60.80	50.00	4.00	0.00
Reverse Primer	TGAATGCGGTCAATGTTTT	784	20	59.52	40.00	4.00	1.00
Product size	154						
Primer Pair 5							
Forward Primer	AACGGCTCAGATCAAGGTCA	630	20	60.80	50.00	4.00	1.00
Reverse Primer	TGAATGCGGTCAATGTTTT	784	20	59.52	40.00	4.00	1.00
Product size	155						
Primer Pair 6							
Forward Primer	AACGGCTCAGATCAAGGTCA	630	20	60.80	50.00	4.00	1.00
Reverse Primer	CATGAATGCGGTCAATGTTT	786	20	59.40	40.00	4.00	1.00
Product size	157						
Primer Pair 7							
Forward Primer	GCCTTACAGATGAGCAATGGA	84	21	60.23	47.62	3.00	0.00
Reverse Primer	GGAACGTGTTGGATTGACCT	663	20	59.83	50.00	4.00	0.00
Product size	580						
Primer Pair 8							
Forward Primer	CGGCTCAGATCAAGGTCAA	632	19	59.93	52.63	4.00	0.00
Reverse Primer	TGAATGCGGTCAATGTTTT	784	20	59.52	40.00	4.00	1.00
Product size	153						
Primer Pair 9							
Forward Primer	GCTCAGATCAAGGTCAATCCA	634	21	60.21	47.62	4.00	0.00
Reverse Primer	TGAATGCGGTCAATGTTTT	784	20	59.52	40.00	4.00	1.00
Product size	151						
Primer Pair 10							
Forward Primer	TGCGAATAAAGCCAACACC	482	19	59.68	47.37	2.00	0.00
Reverse Primer	TGAATGCGGTCAATGTTTT	784	20	59.52	40.00	4.00	1.00
Product size	303						

Şekil 3.1. *Brucella abortus*'a ait IS711 gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu

Brucella abortus - *omp2b*

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Primer Pair 1							
Forward Primer	CGATGTGGTAGTTGGTCGTG	516	20	60.02	55.00	3.00	0.00
Reverse Primer	ATTCGGGCGTAGATGGTAAA	806	20	59.43	45.00	2.00	0.00
Product size	291						
Primer Pair 2							
Forward Primer	GGATTAGAACGAACGCTGGA	64	20	60.21	50.00	2.00	0.00
Reverse Primer	TTACACTGGCACGACCAACT	544	20	59.21	50.00	3.00	1.00
Product size	481						
Primer Pair 3							
Forward Primer	GGATTAGAACGAACGCTGGA	64	20	60.21	50.00	2.00	0.00
Reverse Primer	GTTACACTGGCACGACCAACT	545	21	60.09	52.38	3.00	1.00
Product size	482						
Primer Pair 4							
Forward Primer	AGTTGGTCGTGCCAGTGTA	525	20	59.21	50.00	3.00	1.00
Reverse Primer	ATTCGGGCGTAGATGGTAAA	806	20	59.43	45.00	2.00	0.00
Product size	282						
Primer Pair 5							
Forward Primer	GTAACGGTGAAGCCAGGAAC	167	20	59.60	55.00	3.00	0.00
Reverse Primer	GCACGACCAACTACCACATC	536	20	59.01	55.00	2.00	0.00
Product size	370						
Primer Pair 6							
Forward Primer	GGATTAGAACGAACGCTGGA	64	20	60.21	50.00	2.00	0.00
Reverse Primer	GGCACGACCAACTACCACA	537	19	60.59	57.89	2.00	0.00
Product size	474						
Primer Pair 7							
Forward Primer	GGATTAGAACGAACGCTGGA	64	20	60.21	50.00	2.00	0.00
Reverse Primer	TGGCACGACCAACTACCAC	538	19	60.59	57.89	3.00	0.00
Product size	475						
Primer Pair 8							
Forward Primer	CGAGAACTGGTCGGTGATG	373	19	60.25	57.89	3.00	0.00
Reverse Primer	ATTCGGGCGTAGATGGTAAA	806	20	59.43	45.00	2.00	0.00
Product size	434						
Primer Pair 9							
Forward Primer	CGATGTGGTAGTTGGTCGTG	516	20	60.02	55.00	3.00	0.00
Reverse Primer	TTCGGGCGTAGATGGTAAA	805	19	59.12	47.37	2.00	0.00
Product size	290						
Primer Pair 10							
Forward Primer	GTAACGGTGAAGCCAGGAAC	167	20	59.60	55.00	3.00	0.00
Reverse Primer	GGCACGACCAACTACCACA	537	19	60.59	57.89	2.00	0.00
Product size	371						

Şekil 3.2. *Brucella abortus*'a ait *omp2b* gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu

Coxiella burnetii-com1

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Forward Primer	AAACCTCCGCGTTGTCTTC	165	19	60.25	52.63	4.00	0.00
Reverse Primer	TTTGAAGGGTGATTCGTTCTG	352	21	60.10	42.86	3.00	1.00
Product size	442						
Primer Pair 2							
Forward Primer	AGTGGCAGGCAATCCTCA	54	18	60.36	55.56	3.00	1.00
Reverse Primer	GGTTTGAAGGGTGATTCGTTTC	327	21	60.72	47.62	3.00	1.00
Product size	274						
Primer Pair 3							
Forward Primer	AAACCTCCGCGTTGTCTTC	165	19	60.25	52.63	4.00	0.00
Reverse Primer	GTTTGAAGGGTGATTCGTTCTG	326	22	60.88	45.45	3.00	1.00
Product size	162						
Primer Pair 4							
Forward Primer	AGTGGCAGGCAATCCTCA	54	18	60.36	55.56	3.00	1.00
Reverse Primer	TGGAAGTTATCACGCAGTTGTT	413	22	59.68	40.91	4.00	0.00
Product size	360						
Primer Pair 5							
Forward Primer	AGTGGCAGGCAATCCTCA	54	18	60.36	55.56	3.00	1.00
Reverse Primer	TTGGAAGTTATCACGCAGTTGT	414	22	59.68	40.91	4.00	0.00
Product size	361						
Primer Pair 6							
Forward Primer	AGTGGCAGGCAATCCTCA	54	18	60.36	55.56	3.00	1.00
Reverse Primer	AGTAGCGCGTCGTGGAAA	284	18	60.56	55.56	4.00	0.00
Product size	231						

Şekil 3.3. *Coxiella burnetii*'ye ait *com1* gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu

Coxiella burnetii- IS1111a

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Primer Pair 1							
Forward Primer	GGCGTTTATTGGGTTGGTC	826	19	60.18	52.63	2.00	1.00
Reverse Primer	CTCGGTTGGTGTGTCTCCTT	1160	20	60.15	55.00	2.00	0.00
Product size	335						
Primer Pair 2							
Forward Primer	GGCGTTTATTGGGTTGGTC	826	19	60.18	52.63	2.00	1.00
Reverse Primer	ACTCGGTTGGTGTGTCTCCT	1161	20	59.60	55.00	2.00	0.00
Product size	336						
Primer Pair 3							
Forward Primer	GGCGTTTATTGGGTTGGTC	826	19	60.18	52.63	2.00	1.00
Reverse Primer	TCGGTTGGTGTGTCTCCTT	1159	20	60.55	50.00	2.00	0.00
Product size	334						
Primer Pair 4							
Forward Primer	GGCGTTTATTGGGTTGGTC	826	19	60.18	52.63	2.00	1.00
Reverse Primer	TTATCGGGCTATCGGCTTC	1253	19	60.15	52.63	2.00	0.00
Product size	428						
Primer Pair 5							
Forward Primer	TCGGCGTTTATTGGGTTG	824	18	60.46	50.00	3.00	0.00
Reverse Primer	CTCGGTTGGTGTGTCTCCTT	1160	20	60.15	55.00	2.00	0.00
Product size	337						
Primer Pair 6							
Forward Primer	TCGGCGTTTATTGGGTTG	824	18	60.46	50.00	3.00	0.00
Reverse Primer	ACTCGGTTGGTGTGTCTCC	1161	20	59.60	55.00	2.00	0.00
Product size	338						
Primer Pair 7							
Forward Primer	TCGGCGTTTATTGGGTTG	824	18	60.46	50.00	3.00	0.00
Reverse Primer	TCGGTTGGTGTGTCTCCTT	1159	20	60.55	50.00	2.00	0.00
Product size	336						
Primer Pair 8							
Forward Primer	GGCGTTTATTGGGTTGGTC	826	19	60.18	52.63	2.00	1.00
Reverse Primer	TCGGTTGGTGTGTCTCCTT	1159	19	59.09	52.63	2.00	0.00
Product size	334						
Primer Pair 9							
Forward Primer	GGCGTTTATTGGGTTGGTC	826	19	60.18	52.63	2.00	1.00
Reverse Primer	ACTCGGTTGGTGTGTCTCCTT	1161	21	60.99	52.38	2.00	0.00
Product size	336						
Primer Pair 10							
Forward Primer	TCGGCGTTTATTGGGTTG	824	18	60.46	50.00	3.00	0.00
Reverse Primer	TTATCGGGCTATCGGCTTC	1253	19	60.15	52.63	2.00	0.00
Product size	430						

Şekil 3.4. *Coxiella burnetii*'ye ait IS1111a gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu

Chlamydia abortus - *ompA*

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Primer Pair 1							
Forward Primer	ATCGCTTACGGCAAACACTT	298	20	59.77	45.00	3.00	1.00
Reverse Primer	AACACCAATCAAACCAACGAG	462	21	59.88	42.86	2.00	0.00
Product size	165						
Primer Pair 2							
Forward Primer	CATCGCTTACGGCAAACAC	297	19	60.27	52.63	3.00	0.00
Reverse Primer	GCTCCTAAAGTCGCACAACC	605	20	59.88	55.00	2.00	0.00
Product size	309						
Primer Pair 3							
Forward Primer	ACATCGCTTACGGCAAACA	296	19	60.27	47.37	3.00	1.00
Reverse Primer	GCTCCTAAAGTCGCACAACC	605	20	59.88	55.00	2.00	0.00
Product size	310						
Primer Pair 4							
Forward Primer	ATCGCTTACGGCAAACACTT	298	20	59.77	45.00	3.00	1.00
Reverse Primer	AGTCGCACAACCACACTCC	597	19	59.73	57.89	3.00	0.00
Product size	300						
Primer Pair 5							
Forward Primer	CATCGCTTACGGCAAACAC	297	19	60.27	52.63	3.00	0.00
Reverse Primer	CCTAAAGTCGCACAACCACA	602	20	59.76	50.00	2.00	0.00
Product size	306						
Primer Pair 6							
Forward Primer	ACATCGCTTACGGCAAACA	296	19	60.27	47.37	3.00	1.00
Reverse Primer	CCTAAAGTCGCACAACCACA	602	20	59.76	50.00	2.00	0.00
Product size	307						
Primer Pair 7							
Forward Primer	CAACATCGCTTACGGCAAA	294	19	60.79	47.37	3.00	1.00
Reverse Primer	GCTCCTAAAGTCGCACAACC	605	20	59.88	55.00	2.00	0.00
Product size	312						
Primer Pair 8							
Forward Primer	GCAGAGTTCCAATACGCTCA	604	20	59.03	50.00	3.00	1.00
Reverse Primer	TGACCAGTTTACGCCAATGT	852	20	59.05	45.00	3.00	1.00
Product size	249						
Primer Pair 9							
Forward Primer	AGCAGAGTTCCAATACGCTCA	603	21	60.03	47.62	3.00	1.00
Reverse Primer	TGACCAGTTTACGCCAATGT	852	20	59.05	45.00	3.00	1.00
Product size	250						
Primer Pair 10							
Forward Primer	TTCCCAATGTAGGCATCACTC	491	21	59.95	47.62	3.00	0.00
Reverse Primer	TGACCAGTTTACGCCAATGT	852	20	59.05	45.00	3.00	1.00
Product size	362						

Şekil 3.5. *Chlamydia abortus*'a ait *ompA* gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu

Chlamydia abortus - pmp 90/91

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Primer Pair 1							
Forward Primer	CTTTCAACCAACCCATCACA	3763	20	59.39	45.00	3.00	0.00
Reverse Primer	TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	3989	20	60.67	55.00	3.00	0.00
Product size	227						
Primer Pair 2							
Forward Primer	ACTTTCAACCAACCCATCACA	3762	21	60.26	42.86	3.00	0.00
Reverse Primer	TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	3989	20	60.67	55.00	3.00	0.00
Product size	228						
Primer Pair 3							
Forward Primer	CAACCCATCACATTATCAGCA	3771	21	59.41	42.86	3.00	0.00
Reverse Primer	TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	3989	20	60.67	55.00	3.00	0.00
Product size	219						
Primer Pair 4							
Forward Primer	CCCATCACATTATCAGCAGGA	3774	21	60.87	42.62	3.00	0.00
Reverse Primer	TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	3989	20	60.67	55.00	3.00	0.00
Product size	216						
Primer Pair 5							
Forward Primer	CCCATCACATTATCAGCAGGA	3774	21	60.87	47.62	3.00	0.00
Reverse Primer	TGTTGCGAGTTTAGCAGGAG	3992	20	59.22	50.00	3.00	0.00
Product size	219						
Primer Pair 6							
Forward Primer	TACTTTCAACCAACCCATCACA	3761	22	60.26	40.91	3.00	0.00
Reverse Primer	TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	3989	20	60.67	55.00	3.00	0.00
Product size	229						
Primer Pair 7							
Forward Primer	CCGCTTCTTACAACCTTACCC	2358	21	60.01	52.38	3.00	0.00
Reverse Primer	GGAGATACACACATTGCCTTCA	2945	22	60.00	45.45	3.00	1.00
Product size	588						
Primer Pair 8							
Forward Primer	TCAACCAACCCATCACATTATC	3766	22	59.55	40.91	3.00	1.00
Reverse Primer	TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	3989	20	60.67	55.00	3.00	0.00
Product size	224						
Primer Pair 9							
Forward Primer	CCCATCACATTATCAGCAGGA	3774	21	60.87	47.62	3.00	0.00
Reverse Primer	GTTGCGAGTTTAGCAGGAGAG	3991	21	59.28	52.38	3.00	0.00
Product size	218						
Primer Pair 10							
Forward Primer	CTTTCAACCAACCCATCACATT	3763	22	61.00	40.91	3.00	1.00
Reverse Primer	TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	3989	20	60.67	55.00	3.00	0.00
Product size	227						

Şekil 3.6. *Chlamydia abortus*'a ait pmp 90/91 gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu

Listeria monocytogenes –*hly*

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Primer Pair 1							
Forward Primer	TTAGCATTGATTGCCAGGA	461	20	59.26	40	3.00	1.00
Reverse Primer	GAGACAGATTTCCTTACGG	986	22	60	50	2.00	1.00
Product size	526						
Primer Pair 2							
Forward Primer	AATCAACCCGATGTTCTTCT	418	21	59.82	42.86	3.00	0.00
Reverse Primer	TCACTGTAAGCCATTTCGTCA	641	21	59.33	42.86	3.00	1.00
Product size	224						
Primer Pair 3							
Forward Primer	AAATCAACCCGATGTTCTTCC	417	21	60.18	42.86	3.00	0.00
Reverse Primer	CACTTACGGCAGCGTCAAA	973	19	60.99	52.63	3.00	1.00
Product size	557						
Primer Pair 4							
Forward Primer	AATCAACCCGATGTTCTTCT	418	21	59.82	42.86	3.00	0.00
Reverse Primer	CACTTACGGCAGCGTCAAA	973	19	60.99	52.63	3.00	1.00
Product size	556						
Primer Pair 5							
Forward Primer	CTTAGCATTGATTGCCAGGA	460	21	60.22	42.86	3.00	1.00
Reverse Primer	GAGACAGATTTCCTTACGG	986	22	60.00	50.00	2.00	1.00
Product size	527						
Primer Pair 6							
Forward Primer	CCGATGTTCTTCTGTCAAAAC	425	21	59.58	47.62	3.00	1.00
Reverse Primer	CACTTACGGCAGCGTCAAA	973	19	60.99	52.63	3.00	1.00
Product size	549						
Primer Pair 7							
Forward Primer	AATCAACCCGATGTTCTTCT	418	21	59.82	42.86	3.00	0.00
Reverse Primer	TCACTGTAAGCCATTTCGTCA	642	22	60.67	40.91	3.00	1.00
Product size	225						
Primer Pair 8							
Forward Primer	CAACCCGATGTTCTTCTCTG	421	19	59.07	52.63	3.00	1.00
Reverse Primer	CACTTACGGCAGCGTCAAA	973	19	60.99	52.63	3.00	1.00
Product size	553						
Primer Pair 9							
Forward Primer	CAACCCGATGTTCTTCTCTG	421	19	59.07	52.63	3.00	1.00
Reverse Primer	GAGACAGATTTCCTTACGG	986	22	60.00	50.00	2.00	1.00
Product size	566						
Primer Pair 10							
Forward Primer	GCTGCCGTAAGTGGGAAA	961	18	59.80	55.56	3.00	0.00
Reverse Primer	GCAAATAGATGGACGATGTGAA	1411	22	59.97	40.91	3.00	0.00
Product size	451						

Şekil 3.7. *Listeria monocytogenes*'e ait *hly* gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin NCBI BLAST sonucu

Listeria monocytogenes –iap

Primer Pair	Sequence (5'→3')	start	length	Tm	%GC	self comp.	3' self comp.
Primer Pair 1							
Forward Primer	CTGCTCCAACAATCGCATC	59	19	60.37	52.63	3.00	0.00
Reverse Primer	CGGATAAAGCCCAAATAGTGTC	646	22	59.86	45.45	2.00	1.00
Product size	588						
Primer Pair 2							
Forward Primer	TGCTCCAACAATCGCATC	60	18	59.28	50.00	3.00	0.00
Reverse Primer	CGGATAAAGCCCAAATAGTGTC	646	22	59.86	45.45	2.00	1.00
Product size	587						
Primer Pair 3							
Forward Primer	CTGCTCCAACAATCGCATC	59	19	60.37	52.63	3.00	0.00
Reverse Primer	ACGGATAAAGCCCAAATAGTGTC	647	23	60.59	43.48	2.00	1.00
Product size	589						
Primer Pair 4							
Forward Primer	AGCAACGCAACAACAAACAG	864	20	59.95	45.00	2.00	1.00
Reverse Primer	GTGTAACCAGAGCAATCAAATGTAG	1181	25	59.17	40.00	3.00	0.00
Product size	318						
Primer Pair 5							
Forward Primer	CTGCTCCAACAATCGCATC	59	19	60.37	52.63	3.00	0.00
Reverse Primer	TACGGATAAAGCCCAAATAGTGTC	648	24	60.58	41.67	2.00	1.00
Product size	590						
Primer Pair 6							
Forward Primer	AACGCAACAACAACAGCAC	867	20	59.81	45.00	2.00	0.00
Reverse Primer	GTGTAACCAGAGCAATCAAATGTAG	1181	25	59.17	40.00	3.00	0.00
Product size	315						
Primer Pair 7							
Forward Primer	ACAGCAACGCAACAACAAAC	862	20	59.81	45.00	2.00	0.00
Reverse Primer	GTGTAACCAGAGCAATCAAATGTAG	1181	25	59.17	40.00	3.00	0.00
Product size	320						
Primer Pair 8							
Forward Primer	AACAGCAACGCAACAACAAA	861	20	60.34	40.00	2.00	0.00
Reverse Primer	GTGTAACCAGAGCAATCAAATGTAG	1181	25	59.17	40.00	3.00	0.00
Product size	321						
Primer Pair 9							
Forward Primer	TGCTCCAACAATCGCATC	60	18	59.28	50.00	3.00	0.00
Reverse Primer	ACGGATAAAGCCCAAATAGTGTC	647	23	60.59	43.48	2.00	1.00
Product size	588						
Primer Pair 10							
Forward Primer	AGCACCTAAAGCACCAACAGA	882	21	59.93	47.62	2.00	0.00
Reverse Primer	GTGTAACCAGAGCAATCAAATGTAG	1181	25	59.17	40.00	3.00	0.00
Product size	300						

Şekil 3.8. *Listeria monocytogenes*'e ait iap gen bölgesi için tasarlanan primer çiftlerinin Primer NCBI BLAST sonucu

3.2.3. Simpleks PZR

Brucella abortus, *C. burnetii*, *C. abortus*, *L. monocytogenes*'e ait DNA ekstraktları ile aşağıda belirtilen PZR protokolü ve koşulları uygulanmıştır (Çizelge 3.2 ve 3.3). Bu aşamada suşlara ait spesifik bölgelere göre tasarımı yapılan primerlerin spesifiteleri belirlenmiştir. Tüm PZR çalışmalarına negatif kontroller dahil edilmiştir.

Amplifikasyon işlemi termal ısı döngü cihazında; 94 °C'de 3 dakika süreyle ön denatürasyon sonrasında 30 döngü halinde 94 °C'de 60 saniye DNA denatürasyon, 54 °C'de 60 saniye annealing, 72 °C'de 60 saniye polimerizasyon işlemi ve ardından 72 °C'de 5 dakika bekletilerek amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. PZR Protokolü

PZR bileşenleri	Miktar (µl) / final konsantrasyon
MgCl ₂	2 mM
dNTP	200 µM
Taq 10x Buffer	2,5 µl
Taq DNA polimeraz	1 U
Primer Çiftleri	20 pmol
DNA	2 µl
Toplam	25 µl

Çizelge 3.3. PZR Koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre
94 (ön denatürasyon)	3 dk
94	60 sn
54	60 sn
72	90 sn
72 (uzama)	5 dk

3.2.4. Multipleks PZR

Bir primer çifti ile gerçekleştirilen PZR çalışmaları sonucunda seçilen primer çiftleriyle dubleks ve tripleks PZR çalışmaları yapılmıştır. Simpleks dahil tüm PZR çalışmalarını standardize etmek amacıyla aynı sarf malzeme ve cihazların kullanılmasına dikkat edilmiştir.

3.2.4.1 Dubleks PZR

Simpleks PZR çalışmalarında belirlenen ve her bir bakteriye ait en duyarlı primerler ile dubleks PZR çalışmalarına devam edilmiştir. Bu aşamada iki bakteriye ait birer primer çiftiyle dubleks PZR analizleri gerçekleştirilmiştir. PZR protokol ve koşulları Çizelge 3.2 ve 3.3'e göre yapılmıştır.

3.2.4.2 Tripleks PZR

Dubleks PZR çalışmalarında belirlenen ve her iki bakteriye en duyarlı primerler ile tripleks PZR çalışmalarına devam edilmiştir. Bu aşamada üç bakteriye ait birer primer çiftiyle tripleks PZR analizleri gerçekleştirilmiştir. PZR protokol ve koşulları Çizelge 3.2 ve 3.3'e göre yapılmıştır.

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

Simpleks PZR aşamasından sonra amplifikasyon ürünlerinin varlığı %1.5 agaroz jel kullanılarak belirlenmiştir. Bantların daha net ayırt edilebilmesi için dubleks PZR'de ise %2 ve tripleks PZR'de %2.2 oranında agaroz jel kullanılarak belirlenmiştir. Jel, agaroz (Sigma-Aldrich) ve TBE (Snp Biyoteknoloji) kullanılarak hazırlanmıştır. Homojen hale getirilmiş agaroz çözeltisi içerisine (100 ml) 5 µl Safe Red (Bioshop) ilave edilmiştir. PZR amplifikasyon ürünlerine (10 µl) 2,5 µl yükleme boyası (6X Gel Loading Dye-Thermo Fischer Scientific) eklenerek kuyulara yükleme yapılmıştır. Marker olarak 100 bp DNA ladder (100-1000 bp-Thermo Fischer Scientific) kullanılmıştır. Amplifikasyon ürünleri simpleks PZR 150 V 17 dk, multipleks PZR'de ise 100 V 45 dk yürütülmüştür.

Yürütme işlemi sonrasında DNA bantlarının varlığı görüntüleme cihazında incelenerek belirlenmiştir (Jel Görüntüleme Cihazı, BioRad, ABD).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *B. abortus*, *C. burnetii*, *C. abortus*, *L. monocytogenes*'e ait DNA örnekleri her bir bakteri suşuna göre dizayn edilmiş primer çiftleri kullanılarak kademeli bir şekilde simpleks, dubleks ve tripleks PZR çalışmaları yapılmıştır. Her bir kademedeki PZR çalışmaları sonucunda primer çiftlerinin duyarlılıkları belirlenmiş ve bu çiftlerin farklı kombinasyonları kullanılarak bir üst kademe PZR çalışmaları yapılmıştır.

4.1. Primerlerin Belirlenmesi

Brucella abortus, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Listeria monocytogenes*'e ait simpleks/multipleks PZR çalışmalarında, her bir organizmanın iki gen bölgesi üzerinden dizayn edilerek seçilimi yapılan primerler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Seçilen primer çiftleri

Organizma	Hedef Gen	Oligonükleotid dizileri	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>Brucella abortus</i>	IS711	BaisF1: CCTTCGGCAAATGGACAG	446
		BaisR1: CGATTGTTGGGACACTGGA	
		BaisF2: CTGCGAATAAAGCCAACACC	304
		BaisR2: TGAATGCGGTCAATGTTTTTC	
		BaisF3: GCCTTACAGATGAGCAATGGA	580
		BaisR3: GGAACGTGTTGGATTGACCT	
	omp2b	BaisF4: GCTCAGATCAAGGTCAATCCA	151
		BaisR4: TGAATGCGGTCAATGTTTTTC	
		BaompF1: CGATGTGGTAGTTGGTCGTG	291
		BaompR1: ATTCTGGGCGTAGATGGTAAA	
		BaompF2: GGATTAGAACGAACGCTGGA	474
		BaompR2: GGCACGACCAACTACCACA	
		BaompF3: GTAACGGTGAAGCCAGGAAC	371
		BaompR3: GGCACGACCAACTACCACA	

Çizelge 4.1. Seçilen primer çiftleri (devam)

Organizma	Hedef Gen	Oligonükleotid dizileri	Ürün büyüklüğü (bp)		
<i>Coxiella burnetii</i>	com 1	Cbcom1F1: AAACCTCCGCGTTGTCTTC Cbcom1R1: TTTGAAGGGTGATTTCGTTCTG	442		
		Cbcom1F2: AGTGGCAGGCAATCCTCA Cbcom1R2: GGTTTGAAGGGTGATTTCGTTTC	274		
		Cbcom1F3: AGTGGCAGGCAATCCTCA Cbcom1R3: TGGAAGTTATCACGCAGTTGTT	360		
		Cbcom1F4: AGTGGCAGGCAATCCTCA Cbcom1R4: AGTAGCGCGTCGTGGAAA	231		
	IS1111a	CbisF1: GGCGTTTATTGGGTTGGTC CbisR1: CTCGGTTGGTGTGTCTCCTT	335		
		CbisF2: TCGGCGTTTATTGGGTTG CbisR2: CTCGGTTGGTGTGTCTCCTT	337		
		<i>Chlamydia abortus</i>	ompA	CaompF1: ATCGCTTACGGCAAACACTT CaompR1: AACACCAATCAAACCAACGAG	165
				CaompF2: CATCGCTTACGGCAAACAC CaompR2: GCTCCTAAAGTCGCACAACC	309
	CaompF3: GCAGAGTTCCAATACGCTCA CaompR3: TGACCAGTTTACGCCAATGT			249	
	pmp 90/91		CapmpF1: CTTTCAACCAACCCATCACA CapmpR1: TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG	227	
CapmpF2: CCCATCACATTATCAGCAGGA CapmpR2: TGCGAGTTTAGCAGGAGAGG			216		
CapmpF3: CCGCTTCTTACAACCTTACCC CapmpR3: GGAGATACACACATTGCCTTCA			588		
<i>Listeria monocytogenes</i>	hly	LmhlyF1: TTAGCATTGATTTGCCAGGA LmhlyR1: GAGACAGATTTCCCACTTACGG	526		
		LmhlyF2: AATCAACCCGATGTTCTTCCT LmhlyR2: TCACTGTAAGCCATTTTCGTCA	224		
		LmhlyF3: GCTGCCGTAAGTGGGAAA LmhlyR3: GCAAATAGATGGACGATGTGAA	451		
		iap	LmiapF1: CTGCTCCAACAATCGCATC LmiapR1: CGGATAAAGCCCAAATAGTGTC	588	
	LmiapF2: ACAGCAACGCAACAACAAAC LmiapR2: GTGTAACCAGAGCAATCAAATGTAG		320		
	LmiapF3: AGCACCTAAAGCACCAACAGA LmiapR3: GTGTAACCAGAGCAATCAAATGTAG		300		

Brucella türlerinde değişken sayılarda ve pozisyonlarda bulunan *IS711* dizisi *Brucella abortus*'un tanısında sıkça kullanılmaktadır (Mancilla ve ark., 2011). Yine aynı şekilde dış membran protein grubundan bir porin proteini olan *omp2b* gen bölgesi hem yeterli düzeyde polimorfizme sahip olduğu ve hem de *Brucella* türlerinde yüksek oranda korunduğu için bu organizmaların identifikasyonunda kullanılmaktadır (Fitch ve ark., 1989; Pishva ve ark., 2015). *Coxiella burnetii* identifikasyonunda dış membran proteinini kodlayan ve yüksek oranda korunmuş, *com1* geni kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 1997; Lockhart ve ark., 2011). Bu organizmanın tanımlanmasında yüksek kopya sayısında bulunan *IS1111* geni de kullanılmaktadır. Ancak, diğer *Coxiella* türlerinde bulunmaması ve PZR duyarlılığı göstermesi nedeniyle *IS1111a* geni (transpozaz) *C. burnetii* identifikasyonunda daha fazla kullanılmıştır (Klee ve ark., 2006; Oskam ve ark., 2017). *Chlamydia abortus* türünde ise dış zar membran porin proteinini kodlayan ve yüksek oranda korunmuş *ompA* geni identifikasyonda kullanılmaktadır (Pantchev ve ark., 2010). Ayrıca *pmp 90/91* geni *C. abortus*'un PZR tabanlı identifikasyonunda kullanılan *pmp* gen ailesine ait bir dış zar proteinini kodlamaktadır (Heidari ve ark., 2018; Laroucau ve ark., 2001). Listeriolysin O proteini kodlayan *hly* ve p60 proteini kodlayan *iap* genleri PZR duyarlılığının yüksek olması nedeniyle *Listeria* türlerinin PZR tabanlı identifikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Volokhov ve ark., 2002; Le Monnier ve ark., 2011; Bubert ve ark., 1999).

Primer seçimi PZR protokolünde en kritik aşamadır ve özellikle mPZR'de fonksiyonel bir primer tasarımı olmadan başarılı bir amplifikasyon gerçekleştirilememektedir (Dieffenbach ve ark., 1993). Hedeflenen DNA bölgesine yüksek özgünlüğün sağlanması ve spesifik olmayan bölgelere bağlanmanın önüne geçilmesi amacıyla web tabanlı ücretsiz çevrimiçi primer tasarım platformları kullanılabilmektedir (Primer-BLAST modülü) (Ye ve ark., 2012). Kilit nokta olan primerlerde uzunluğun bağlanma verimini etkilemesi nedeniyle 17-25 baz uzunluğundaki oligonükleotidler tasarlanmış ve bunlar arasından seçim yapılmıştır. Erime sıcaklığı (T_m) değerlerinin çok düşük veya çok yüksek olması özgün olmayan bağlanmalara ve farklı miktarlarda ürün amplifikasyonuna neden olacağından simpleks ve multipleks PZR'de birlikte kullanılabilirlik için yakın T_m değerlerine sahip tasarımlar yapılmıştır (Bej ve ark., 1991; Kahya ve ark., 2013). Rutinde primer tasarımlarında G+C içeriği genellikle %40-60 arasında değişiklik göstermektedir. Çalışmamızda kullandığımız primerlerde de

hedef bölge hassasiyetinin korunması ve daha güçlü bağlanma afinitesinin sağlanabilmesi için baz kompozisyonunda dengeli bir G/C yüzdesi olmasına dikkat edilmiştir (Mitsubishi, 1996; Robertson ve Walsh-Weller, 1998).

Reaksiyon ortamında birden fazla primerin olması primer-dimeri oranının artmasına, az veya hiç ürün elde edilememesine, yanlış eşleşme sonucu istenmeyen PZR ürünlerinin açığa çıkmasına veya kısa DNA parçalarının amplifikasyonuna neden olmaktadır (Robertson ve Walsh-Weller, 1998). Bu faktörler göz önüne alınarak dimer ve saç tokası yapıları oluşturmayacak dizilerin tasarımı ve sonrasında primer çiftlerinin birbirleri ile uyumlarına bakılarak PZR çalışmalarında kullanılacak primer çiftleri seçilmiştir.

Çalışma kapsamında primer seçiminde göz önüne alınan diğer bir faktör ise spesifite olmuştur. Bu amaçla ayrıntılı literatür çalışması yapılarak seçilen primerlerin daha önce başka çalışmalarda kullanılıp kullanılmadığı belirlenmiştir. Buna göre *Brucella abortus* için seçilen primer dizilerinden sadece BaSR3: GGAACGTGTTGGATTGACCT ve BaompF1: CGATGTGGTAGTTGGTCGTG dizilerinin iki çalışmada kullanıldığı tespit edilmiştir (Prakash ve ark., 2019; Tian ve ark., 2014). Ancak çalışmamızda bu iki primer dizisi sadece simpleks PZR aşamasında kullanılmış ve istenilen düzeyde amplifikasyon sağlanamadığı için multipleks PZR aşamalarında kullanılmamıştır. Dolayısıyla *Brucella abortus* için seçilen diğer primer dizileri ile *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* ve *Listeria monocytogenes* için seçilen primerlerin (Çizelge 4.1) literatür araştırmaları sonucu daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmadığı tespit edilmiştir. Bu primerler ilk kez bu çalışma kapsamında kullanılmıştır.

4.2. Simpleks PZR sonuçları

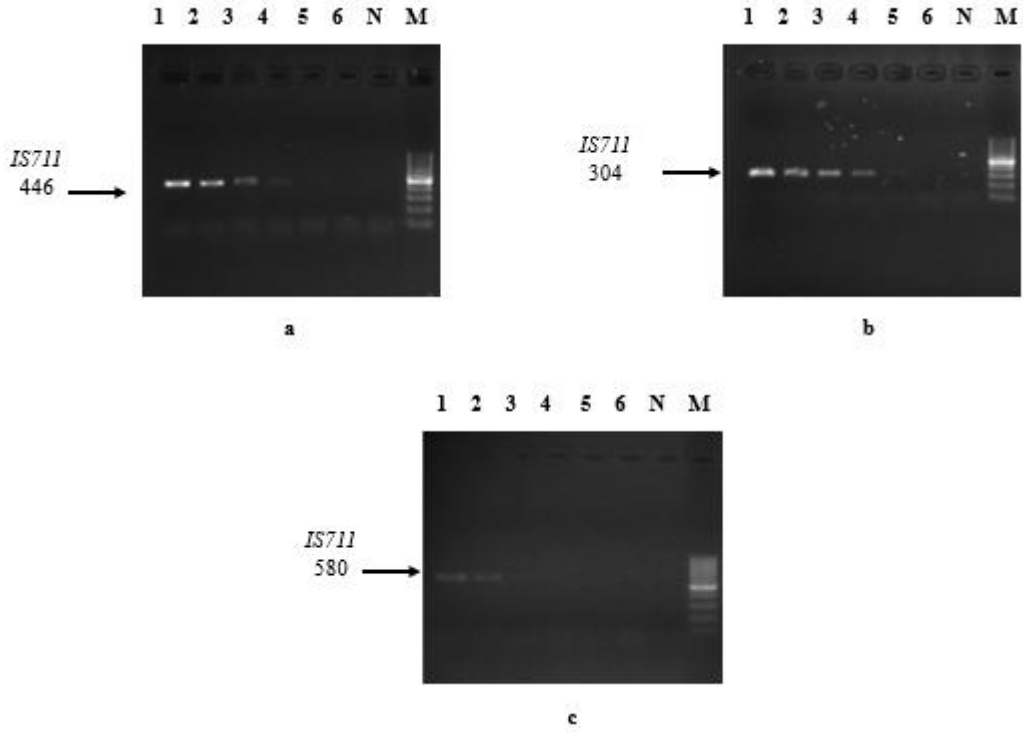
Brucella abortus ve *Coxiella burnetii* için seçilen 7, *Chlamydia abortus* ve *Listeria monocytogenes* için seçilen 6 primer çifti (Çizelge 4.1) ve 10^{-1} - 10^{-6} sulandırımı yapılmış DNA'lar ile gerçekleştirilen simpleks PZR çalışmaları sonucunda amplifikasyon ürünleri %1.5 oranında hazırlanan agaroz jelde 150 V'da 17 dk yürütülerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1-4.8). PZR çalışmaları sonucunda primerlerin hassasiyeti ve

spesifitesi jellerde gözlemlenen bantların belirginliği üzerinden kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

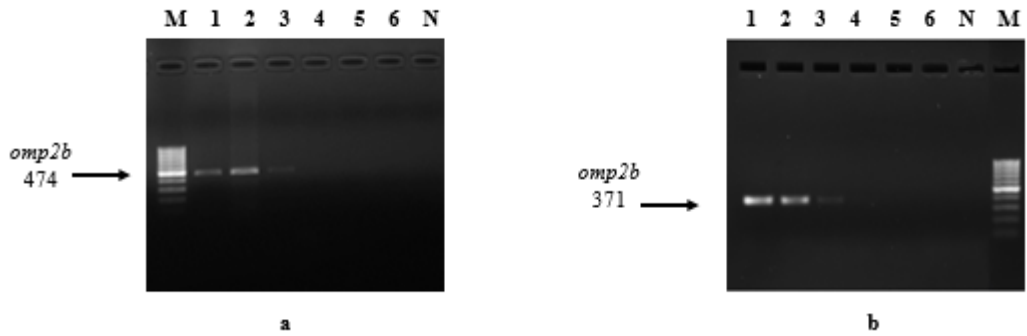
4.2.1. *Brucella abortus* simpleks PZR sonuçları

Çizelge 4.1’de verilen 7 primer çifti ve azalan konsantrasyonlardaki DNA’lar ile simpleks PZR çalışmaları yapılmış ve bant gözlemlenen jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. *IS711* geni için kullanılan BaisF4/BaisR4 primer çifti ve *omp2b* geni için kullanılan BaompF1/BaompR1 primer çifti ile yapılan PZR çalışması sonucunda amplifikasyon ürünü gözlenmemiştir.

IS711 geni için 446 bp ve 304 bp uzunluğundaki bölgeleri belirleyen primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda sırasıyla 10^{-4} ve 10^{-5} (8×10^{-4} ng/ μ l) oranında seyreltilmiş DNA varlığında amplifikasyon miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1 a-c). *omp2b* geninde ise 474 ve 371 bp uzunluğundaki bölgelere ait primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda 10^{-3} oranında seyreltilmiş DNA varlığında amplifikasyon miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2 a-b).



Şekil 4.1. *B. abortus* IS711 geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) BaIsF1/BaIsR1 primer çifti ile çoğaltılan 446 bp uzunluğundaki bölge b) BaIsF2/BaIsR2 primer çifti ile çoğaltılan 304 bp uzunluğundaki bölge c) BaIsF3/BaIsR3 primer çifti ile çoğaltılan 580 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10⁻¹ ve 10⁻⁶ DNA)



Şekil 4.2. *B. abortus* omp2b geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) BaompF2/BaompR2 primer çifti ile çoğaltılan 474 bp uzunluğundaki bölge b) BaompF3/BaompR3 primer çifti ile çoğaltılan 371 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10⁻¹ ve 10⁻⁶ DNA)

Brucella abortus için belirlenen 5 farklı primer çifti ve 10^{-6} 'ya kadar seri sulandırılmış kalıp DNA'larla yapılan simpleks PZR çalışmaları sonucunda genel olarak tüm primer çiftlerinin 0,8 ng/ μ l (10^{-2}) DNA konsantrasyonuna duyarlı olduğu belirlenmiştir. En yüksek hassasiyet ise 8×10^{-3} ng/ μ l'de (10^{-3} seyreltme) bant görülen BaisF2/BaisR2 primer çiftinde tespit edilmiştir.

İnsanlarda düşük nedeni olarak *Brucella abortus*'un moleküler (PZR) yöntemle belirlenmesine yönelik çalışmaya rastlanmamıştır. Hayvanlarda ise bir adet çalışma bulunmuştur. Bu çalışmada 2004-2006 yılları arasında Arjantin'de spontan düşük yapan 150 sığıra ait fetüs örneklerinden *IS711* genine ait 498 bp uzunluğundaki bölgenin varlığı PZR ile çalışılmış ve örneklerin yaklaşık %7'sinin *Brucella abortus* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Morrell ve ark., 2019). Elfaki ve arkadaşları (2005) Bruselloz şüphesi olan hastalardan alınan kan örneklerini *Brucella* cinsine spesifik *BCSP31* geni yönünden tarayarak pozitif çıkan örneklerde *IS711* geni üzerinden *Brucella abortus* identifikasyonu gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda serolojik testlerin PZR sonuçları ile örtüşmediği bildirilmiştir. Probert ve arkadaşları (2004) *Brucella abortus* tanısı için *IS711* genine spesifik primerler kullanarak real-time PZR çalışmaları gerçekleştirmiştir. PZR çalışmaları sonucunda *B. abortus* için PZR hassasiyetinin %92 ve spesifitesinin %100 olduğu bildirilmiştir. Bruselloz şüphesi bulunan hastalardan alınan kan örneklerinden *Brucella* cinsine spesifik *IS711*'in dahil olduğu iki gen bölgesi çalışılmıştır. *IS711* genine ait 498 bp uzunluğundaki bölgenin PZR ile çalışılması sonucunda örneklerin %63.8'inde *Brucella abortus* teşhis edilmiş ve türe spesifik PZR çalışmasında hassasiyetin %82 olduğu bildirilmiştir (Garshasbi ve ark., 2014). Mirnejad ve arkadaşları (2013) da Bruselloz şüphesi bulunan hastaların periferik kan örneklerinden *IS711* bölgesinin dahil olduğu iki gen üzerinden PZR ile çalışma gerçekleştirmiştir. *IS711*'in 494 bp uzunluğundaki bölgenin çalışılması neticesinde hastaların %23'ünün *Brucella abortus* ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar klinik örneklerde *Brucella* türlerinin saptanmasında moleküler (PZR) tekniklerin basit, ucuz ve hızlı bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Koyun ve keçilerden toplanan serum ve süt örnekleri ile yapılan diğer bir çalışmada seropozitif örnekler PZR çalışması ile moleküler olarak değerlendirilmiş ve *Brucella abortus*'a spesifik *IS711* bölgesi ile yapılan çalışma sonrasında bu örneklerin %75'inin pozitif olduğu bildirilmiştir (Ali ve ark., 2015).

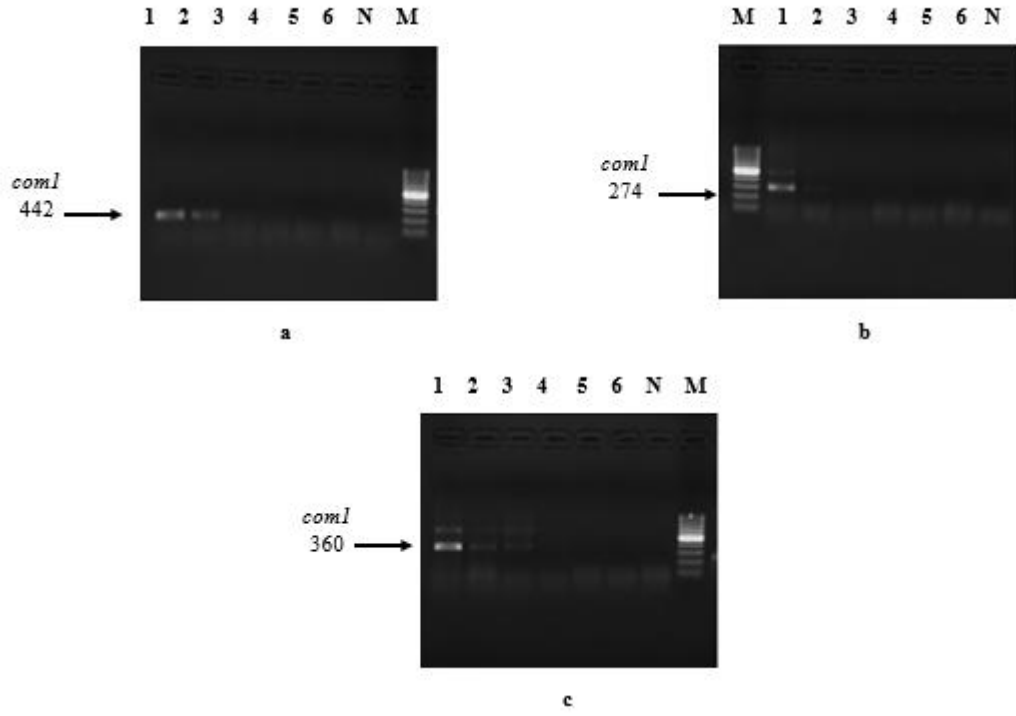
Imaoka ve arkadaşları (2007) *omp2b* gen bölgesi için tasarladıkları primerleri kullanarak *Brucella abortus* türünün identifiye edilebileceğini bildirmişlerdir. Hayvan ve insan kaynaklı kan ve süt örneklerinden *Brucella* spp.'nin PZR tabanlı identifikasyonunda *omp2* gen bölgesi kullanılmış ve PZR yönteminin identifikasyon için yeterli hassasiyete sahip olduğu bildirilmiştir (Leal-Klevazas ve ark., 1995). Zamanian ve arkadaşları (2015) insan ve hayvanlardan alınan klinik örneklerde PZR tabanlı Bruselloz teşhisi için *omp2* ve diğer gen bölgelerine (*BCSP31* ve 16S rRNA) yönelik spesifik primerler kullanmıştır. Çalışma sonucunda insan kaynaklı örneklerde daha yüksek oranda pozitif sonuç alınması nedeniyle insan brusellozunun PZR ile daha kolay tespit edilebileceği belirtilmiştir. Ayrıca İran'da yapılan bir çalışmada koyun ve ineklerden alınmış çiğ süt örneklerindeki *Brucella* prevalansı spesifik primerlerin kullanıldığı (*BCSP31*) PZR çalışmasıyla *Brucella abortus* ve *Brucella* spp. suşları ile belirlenebilmiştir (Satei ve ark., 2020).

4.2.2. *Coxiella burnetii* simpleks PZR sonuçları

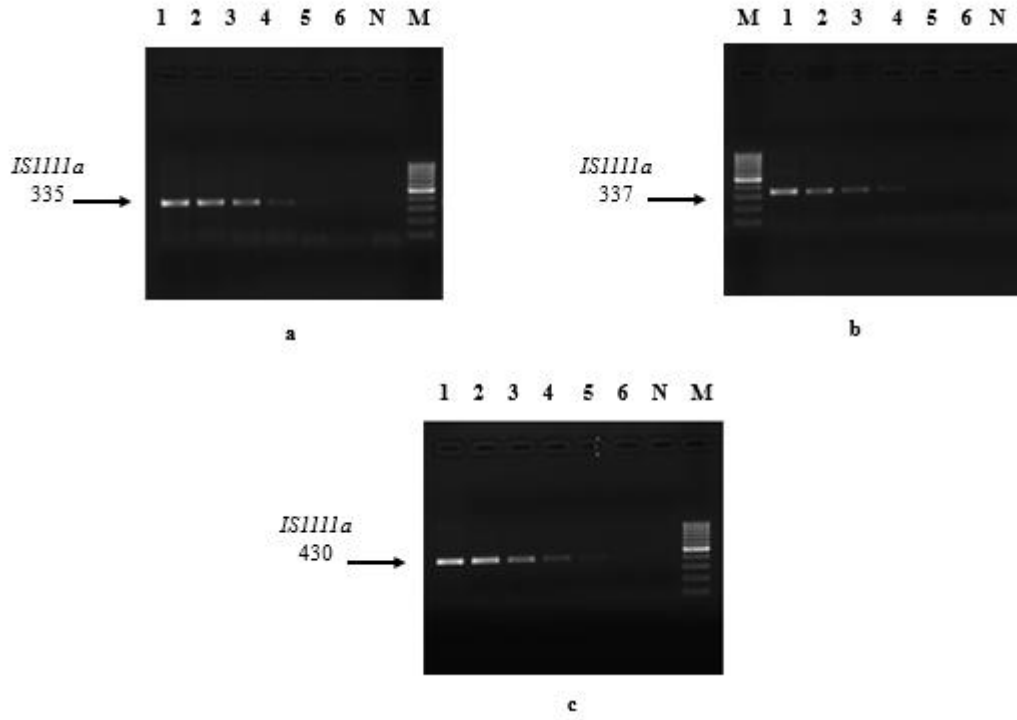
Coxiella burnetii'ye ait seçimi yapılan 7 primer çifti (Çizelge 4.1) ve 10^{-6} 'ya kadar onluk seri sulandırılmış DNA'lar ile simpleks PZR çalışmaları yapılmış ve bant gözlemlenen jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.3 ve 4.4'de verilmiştir. Çalışma sonucunda *com1* geni için kullanılan Cbcom1F4/Cbcom1R4 primer çifti ile yapılan PZR çalışması sonucunda amplifikasyon ürünü gözlenmemiştir.

com1 geni için 442 bp, 274 bp ve 360 bp uzunluğundaki bölgeleri belirleyen primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda gözlemlenebilir amplifikasyon ürünleri belirlenmiştir. (Şekil 4.3 a-c) *IS1111a* geni için ise 335 bp, 337 bp ve 430 bp uzunluğundaki bölgelere ait primer çiftleri ile yapılan PZR çalışmasında diğer gen bölgesine göre daha yüksek amplifikasyon sağlanmıştır (Şekil 4.4 a-c).

com1 bölgesine ait primerler ile yapılan çalışmalarda yüksek DNA konsantrasyonlarında ürün gözlenmiş olup 360 ve 274 bp uzunluğundaki bölgelere ait çalışmalarda ikinci bir bölgenin de çoğaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle spesifitesinin yüksek olmadığı görülmektedir. *IS1111a* bölgesine ait primerlerin spesifitesinin ve 10^{-4} sulandırım oranındaki (0.038,12 ng/ μ l) kalıp DNA varlığında PZR ürünü oluşması nedeniyle hassasiyetinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. *C. burnetii* *com1* geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) Cbcom1F1/Cbcom1R1 primer çifti ile çoğaltılan 442 bp uzunluğundaki bölge b) Cbcom1F2/Cbcom1R2 primer çifti ile çoğaltılan 274 bp uzunluğundaki bölge c) Cbcom1F3/Cbcom1R3 primer çifti ile çoğaltılan 360 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10⁻¹ ve 10⁻⁶ DNA)



Şekil 4.4. *C. burnetii* IS1111a geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) CbısF1/CbısR1 primer çifti ile çoğaltılan 335 bp uzunluğundaki bölge b) CbısF2/CbısR2 primer çifti ile çoğaltılan 337 bp uzunluğundaki bölge c) CbısF3/CbısR3 primer çifti ile çoğaltılan 430 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10⁻¹ ve 10⁻⁶ DNA)

Cezayir’de ateşli spontan düşük vakaları qPZR ile *IS1111* geni yönünden taranmış ve ateşli spontan düşüklere *C. burnetii* enfeksiyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ghaoui ve ark., 2018). Vaidya ve arkadaşları (2008) kendiliğinden düşük yapan hastalarda *IS1111* bölgesi üzerinden trans ve real-time PZR ile *C. burnetii* varlığını çalışmış ve vakaların yaklaşık %20’sinin *C. burnetii* yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar her iki PZR yönteminin serolojik yöntemlere göre %84 oranında daha hassas olduğunu ve klinik örneklerde *C. burnetii* miktarı veya varlığının belirlenmesinde real-time PZR’nin oldukça iyi bir test olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmaların yanı sıra ülkemizde tekrarlayan düşük olgusu gösteren kadınlardan alınan tam kan ve plasenta örnekleri *IS1111* bölgesi üzerinden PZR ile taranmış ancak *Coxiella burnetii* yönünden pozitif sonuç alınmadığı bildirilmiştir (Eyigör ve ark., 2013). Düşük olgularının yanı sıra farklı kaynaklardan moleküler yöntemlerle *C. burnetii* identifikasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Klaasen ve arkadaşları (2014) koyun ve

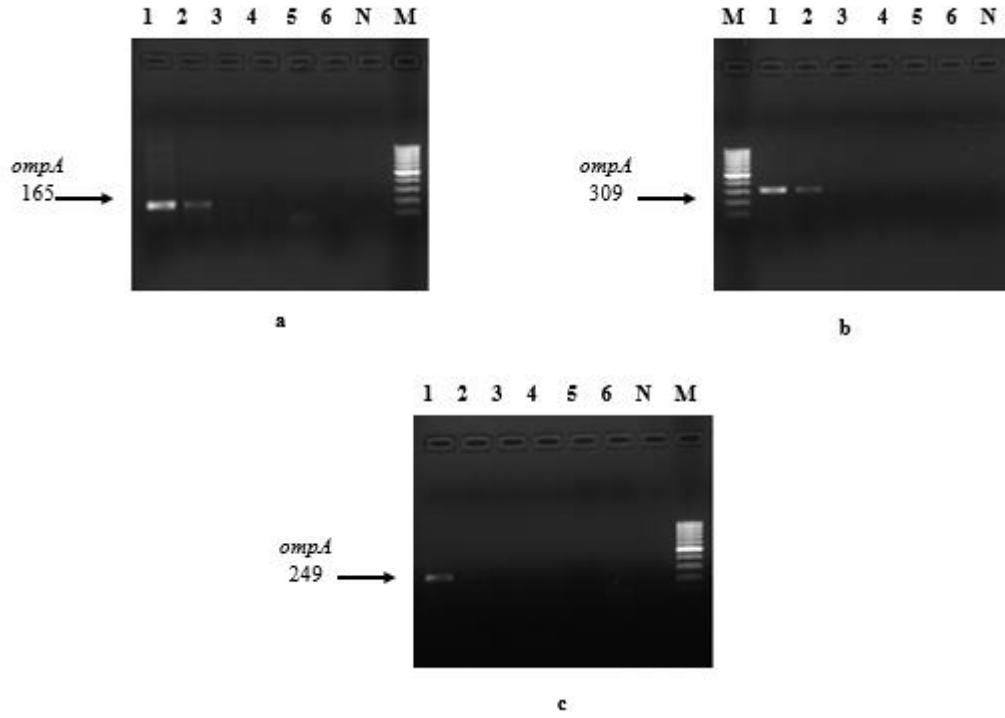
keçilerden alınan serum ve süt örneklerinden *C. burnetii* identifikasyonu için *IS1111a* bölgesine spesifik primerler kullanarak süt örneklerinde *C. burnetii* tespit etmişlerdir. Sığırlardan alınan plasenta örnekleri ile yapılan diğer bir çalışmada *C. burnetii* identifikasyonu için *IS1111a* ve *icd* gen bölgeleri kullanılmış ve örneklerin sadece *C. burnetii* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Hansen ve ark., 2011). Ülkemizde yapılan bir çalışmada sığır, koyun ve keçilerdeki düşük sonrası fetüsten alınan örneklerde *IS1111* genine spesifik primerler kullanılarak *C. burnetii* varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ruminantlarda düşüklerin *C. burnetii* ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Günaydın ve ark., 2015). Koyun ve keçi sürüleri içerisinde düşük geçmişi olan ve olmayan hayvanlardan toplanan süt örneklerinde PZR ile *IS1111* geni taranmış ve çalışma sonucunda her iki örnek grubunda pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle araştırmacı PZR ile kısa sürede *C. burnetii* tespitinin yapılabileceğini ve PZR'nin tedavi/kontrol önlemlerinin alınmasında avantaj sağlayacağını bildirmiştir (Kılıç, 2017).

Gürbilek ve arkadaşları (2018) koyun, keçi ve sığırlarda düşük sonucundaki fetüs örneklerinden *com1* gen bölgesine spesifik primerler kullanarak *C. burnetii* identifikasyonu gerçekleştirmiştir. Yine bu araştırmacılar da *C. burnetii* identifikasyonunda PZR'nin hızlı ve güvenilir bir teknik olduğu vurgulamışlardır. Düşük olgularının yanı sıra insan serum örneklerinden *C. burnetii* teşhisi amacıyla *com1* genine ait 438 bp uzunluğundaki bölgeye göre tasarlanan primerler ile yapılan amplifikasyon sonucunda insan kaynaklı serum örneklerinden *C. burnetii* teşhisinde PZR'nin hassas, spesifik ve kullanışlı bir yöntem olacağı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 1998). El-Mahallawy ve arkadaşlarının (2016) Çin'de yaptıkları bir çalışmada insan ve hayvanlardan alınan kan ve süt örneklerinde *C. burnetii*'nin PZR ile identifikasyonunda *com1* geni kullanılmış ve kan örnekleri hariç süt örneklerinde *C. burnetii* varlığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar seropozitiflik oranının insan ve hayvanlarda değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ukrayna'da yapılan bir çalışmada *com1* genine spesifik *CoxF2* ve *CoxR4* primerleri ile 689 bp uzunluğundaki bölge çoğaltılarak *C. burnetii* varlığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *C. burnetii* teşhisinde PZR yönteminin hassas olduğu vurgulanmıştır (Marushchak ve ark., 2020).

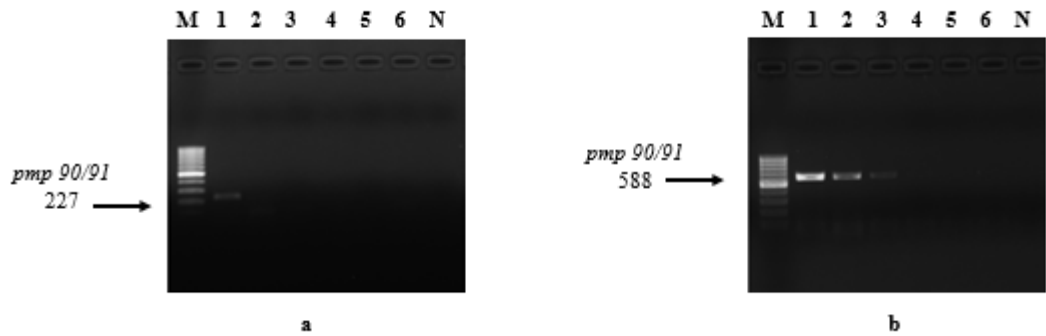
4.2.3. *Chlamydia abortus* simpleks PZR sonuçları

Çizelge 4.1’de verilen 6 primer çifti ile simpleks PZR çalışmaları yapılmış ve bant gözlemlenen jel elektroforez sonuçları Şekil 4.5 ve 4.6’da verilmiştir. *ompA* geni için kullanılan CaompF3/CaompR3 primer çifti ve *pmp 90/91* geni için kullanılan CapmpF1/CapmpR1 primer çifti ile yapılan PZR çalışması sonucunda yeterli düzeyde amplifikasyon ürünü gözlenmezken, *pmp 90/91* geni için kullanılan CapmpF2/CapmpR2 primer çifti ile yapılan PZR çalışmasında hiç amplifikasyon ürünü görülmemiştir.

ompA geninde 165 bp ve 309 bp uzunluğundaki bölgeleri belirleyen primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda 10^{-2} (0,688 ng/ μ l) seyreltme oranındaki DNA varlığında amplifikasyon oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5 a-c). *pmp 90/91* geninde ise 588 bp uzunluğundaki bölgelere ait primer çifti ile yapılan PZR sonucunda belirgin amplifikasyon gözlenmiştir. Ayrıca gen için kullanılan tüm primer çiftleri arasında 10^{-3} seyreltme oranındaki kalıp DNA varlığında en yüksek amplifikasyon oranı ve hassasiyet CapmpF3/CapmpR3 primer çiftinde belirlenmiştir (Şekil 4.6 b).



Şekil 4.5. *C. abortus* *ompA* geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) CaompF1/CaompR1 primer çifti ile çoğaltılan 165 bp uzunluğundaki bölge b) CaompF2/CaompR2 primer çifti ile çoğaltılan 309 bp uzunluğundaki bölge c) CaompF3/CaompR3 primer çifti ile çoğaltılan 249 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10⁻¹ ve 10⁻⁶ DNA)



Şekil 4.6. *C. abortus* *pmp 90/91* geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) CapmpF1/CapmpR1 primer çifti ile çoğaltılan 227 bp uzunluğundaki bölge b) CapmpF3/CapmpR3 primer çifti ile çoğaltılan 588 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10⁻¹ ve 10⁻⁶ DNA)

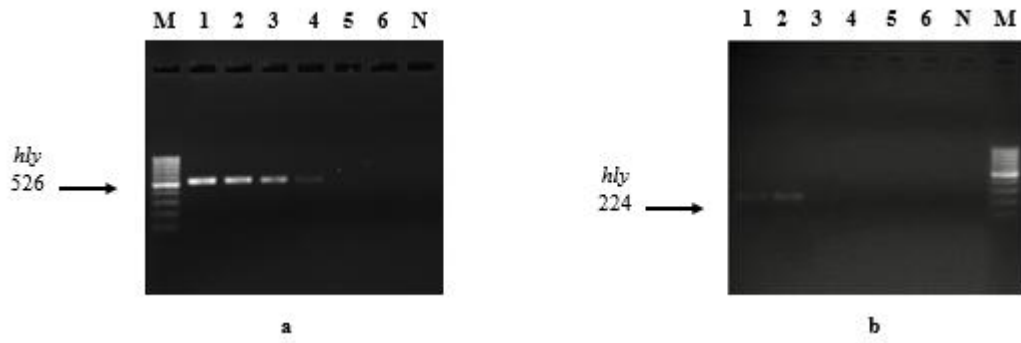
Kadınlarda *Chlamydia abortus*'un düşükle ilişkisine dair çalışmaya rastlanılmamıştır ancak enfekte keçiyile temas etmiş ve influenza benzeri şikayetleri olan hamile kadından alınan örnek 16S rRNA dizilemesi ile *C. abortus* yönünden analiz edilerek pozitif bulunduğu bildirilmiştir (Meijer ve ark., 2004). Livingstone ve arkadaşları (2009) koyunlardan alınan plasenta örneklerinde *C. abortus* teşhisini *ompA* gen bölgesine spesifik primerler kullanarak gerçekleştirmiştir. Kılıç ve arkadaşları (2010) da *ompA* gen bölgesini hedef alan primerler kullanarak düşük yapan sığır fetüsünde *Chlamydia abortus* teşhisi yapmışlardır. Ürdün'de yapılan bir çalışmada koyun ve keçi kaynaklı plasental doku ve vajinal swap örneklerinde PZR ile *omp2* gen bölgesine ait 587 bp uzunluğundaki bölge amplifiye edilerek *C. abortus* varlığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda koyun ve keçilerde *C. abortus*'un düşüğe neden olduğunu belirtilmiştir (Ababneh ve ark., 2014). Düşük vakalarının bulunduğu keçi sürülerinden alınan doku örneklerinde serolojik ve moleküler yöntemlerle *C. abortus* taraması yapılmış, *pmp 90/91* gen bölgesine ait spesifik primerlerin kullanıldığı PZR sonucunda *C. abortus* tanısı konulmuştur. Bu çalışma ile araştırmacılar PZR tabanlı moleküler tanının serolojik tanıya göre daha güvenilir olduğunu belirtmişlerdir (Campos-Hernández ve ark., 2014). Laroucau ve arkadaşları (2001) düşük vakalarının görüldüğü koyun sürülerinden alınan örneklerle yaptıkları çalışmada, *ompA* ve *pmp* genlerine spesifik primerler ile PZR duyarlılığını test etmişlerdir. *Chlamydia abortus*'a ait *pmp* gen familyası ile ilgili yapılan PZR çalışmalarında diğer *Chlamydia* türleri yönünden amplifikasyon görülmediği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise düşük yapan koyunlardan alınan klinik örnekler *Chlamydia abortus* yönünden PZR ve serolojik yöntemlerle taranmış ve vajinal swap ekstraktları üzerinden klamidyal düşük tanısında PZR'nin kullanışlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Güler ve ark., 2006). Li ve arkadaşlarının (2015) düşük yapmış tıbet öküzlerine ait fetüsleri *pmp* geni yönünden taradıkları çalışmada örneklerin tümünün pozitif bulunduğu ve *C. abortus* enfeksiyonunun tıbet öküzlerinde düşükle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

4.2.4. *Listeria monocytogenes* simpleks PZR sonuçları

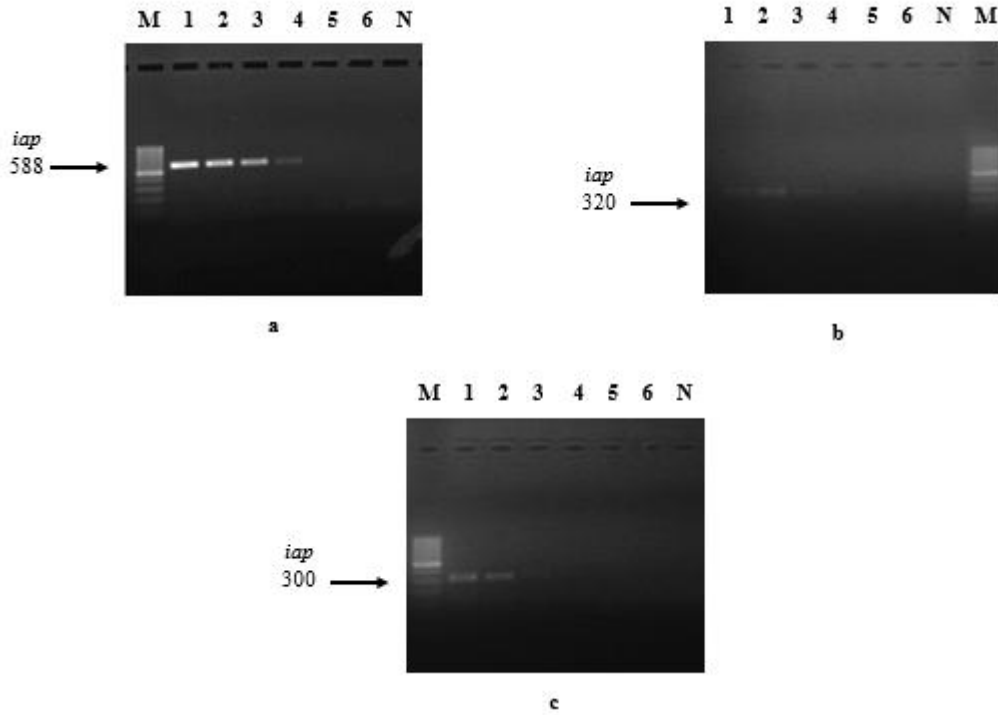
Listeria monocytogenes'e ait seçimi yapılan 6 primer çifti (Çizelge 4.1) ile PZR çalışmaları yapılmış ve bant gözlemlenen jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.7 ve 4.8'de verilmiştir. Çalışma sonucunda *hly* geni için kullanılan LmhlyF2/LmhlyR2 primer çifti

ve *iap* geni için kullanılan LmiapF2/LmiapR2 primer çifti ile yapılan PZR sonucunda yeterli düzeyde amplifikasyon ürünü gözlenmemiştir.

hly geni için 526 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen primer çifti ile yapılan PZR sonucunda amplifikasyon oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7 a-b). *iap* geninde ise 588 bp ve 300 bp uzunluğundaki bölgelere ait primer çifti ile yapılan PZR sonucunda belirgin amplifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.8 a-c). *hly* 526 ve *iap* 588 bölgelerine ait primer çiftleri ile 10^{-4} 'e kadar (0,00885 ng/ μ l) seyreltme oranına sahip kalıp DNA varlığında yüksek amplifikasyon gözlenmiştir. Dolayısıyla diğer primer çiftlerine göre hassasiyetlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7. *L. monocytogenes hly* geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) LmhlyF1/LmhlyR1 primer çifti ile çoğaltılan 526 bp uzunluğundaki bölge b) LmhlyF2/LmhlyR2 primer çifti ile çoğaltılan 224 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10^{-1} ve 10^{-6} DNA)



Şekil 4.8. *L. monocytogenes* *iap* geni için seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) LmiapF1/LmiapR1 primer çifti ile çoğaltılan 588 bp uzunluğundaki bölge b) LmiapF2/LmiapR2 primer çifti ile çoğaltılan 320 bp uzunluğundaki bölge c) LmiapF3/LmiapR3 primer çifti ile çoğaltılan 300 bp uzunluğundaki bölge (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-6: 10^{-1} ve 10^{-6} DNA)

Hamile kadınlardan alınan klinik örneklerde virülans ile ilişkili genler olan *hlyA* ve *iap* genleri PZR tekniği ile araştırılmış ve diğer virülans genleri ile birlikte bu genlerin varlığı gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarının çevre, gıda ve insan klinik örneklerinde *L. monocytogenes* prevalansının rutin taraması ve patojen epidemiyolojinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacağı bildirilmiştir (Soni ve ark., 2015). Kaur ve arkadaşları (2007) spontan düşük yapan kadınlarda aralarında *hlyA* ve *iap* genlerinin bulunduğu virülans genlerine ait 456 ve 131 bp uzunluğundaki bölgeleri PZR ile çalışarak kendiliğinden düşük vakalarının %3.3'ünde patojenik *L. monocytogenes* varlığını bildirmişlerdir. Spontan düşük vakalarından patojenik *L. monocytogenes* suşlarının etkinliğinin gösterilmesi amacıyla çalışma önem arz etmektedir. Le Monnier ve arkadaşları (2011) *hly* gen bölgesinin amplifikasyonu ile Listeriyoz şüphesi olan hastalardan alınan beyin omurilik sıvısında *L. monocytogenes* varlığı belirlemiş ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında PZR ile hızlı teşhis yapıldığını bildirmişlerdir.

Heidarzadeh ve arkadaşları (2018) tarafından hamile kadınlardan alınan vajinal swap örneklerinde biyokimyasal analizlerle *L. monocytogenes* varlığı belirlenmiş ve pozitif bulunan örnekler *hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlC*, *inlJ* ve *prfA* virülans genleri yönünden taranmıştır. Taranan örneklerde *L. monocytogenes hlyA* geni tespit edilmiştir. Lübnan’da gıda marketlerinden toplanan örneklerde *L. monocytogenes* varlığını belirlemek amacıyla *hly*, *actA* ve *inlB* virülans genleri üzerinden PZR çalışması yapılmış, örneklerin %100’ünde *hly* ve *actA* genleri tespit edilmiştir (Haidar-Ahmad ve ark., 2016). Tavuk, sığır ve domuz etinde PZR tekniği ile *L. monocytogenes* saptanmasının standardizasyonu ile ilgili çalışmada *iap* geninin 453 bp uzunluğundaki fragmenti de çalışılmıştır. *L. monocytogenes*’e spesifik *iap* geninin amplifikasyonunu sağlayan PZR tekniğinin standart mikrobiyolojik teknikten çok daha duyarlı ve spesifik olduğu bildirilmiştir (De la Rosa Zariñana ve ark., 2017). Lozano ve arkadaşları (2013) da sığır etinde *iap* geninin 453 bp uzunluğundaki kısmın PZR ile amplifikasyonu sonucu *Listeria monocytogenes* varlığı test edilmiştir. Örneklerin yaklaşık %28’inin *L. monocytogenes* yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir. Sanitasyon ve standardizasyon prosedürlerinin geliştirilerek önleyici ve koruyucu kontrol programlarına katkı sunması açısından PZR çalışmasının önemi belirtilmiştir.

4.3. Multipleks PZR sonuçları

Brucella abortus, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* ve *Listeria monocytogenes* için yapılan simpleks PZR çalışmaları sonucunda multipleks aşamalarda kullanılacak primer çiftleri seçilmiştir. Primer seçimlerinde hassasiyet, spesifite ve jellerde ayırımın daha net sağlanacağı bölge büyüklükleri göz önüne alınmıştır. Seçim aşamasında bir organizmaya ait DNA sabit tutularak diğer 3 organizmaya ait her bir gen bölgesi için belirlenen birer primer çifti kombinasyonu ile PZR çalışmaları 10^{-6} ’ya kadar seyreltilmiş 6 farklı kalıp DNA konsatrasyonunda gerçekleştirilmiştir. PZR çalışmaları sonucunda tüm primer çiftlerinin ilgili organizmaya ait gene spesifik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Primer çiftlerinin hassasiyet ve spesifiteleri

Organizma	Primer	Ürün büyüklüğü (bp)	Hassasiyet (kalıp DNA miktarı ng/µl)						Spesifite
			-1	-2	-3	-4	-5	-6	
<i>B. abortus</i>	BaisF2/BaisR2	304	+	+	+				+
	LmhlyF1/LmhlyR1	526							
	BaisF2/BaisR2	304	+	+					+
	LmiapF1/LmiapR1	588							
	BaompF2/BaompR2	474	+	+					+
	LmhlyF1/LmhlyR1	526							
	BaompF2/BaompR2	474	+	+					+
	LmiapF1/LmiapR1	588							
	BaisF2/BaisR2	304	+	+	+				+
	CbisF3/CbisR3	430							
	BaompF2/BaompR2	474	+						+
	CbisF3/CbisR3	430							
	BaisF2/BaisR2	304	+	+					+
	CaompF2/CaompR2	309							
	BaisF2/BaisR2	304	+	+	+				+
	CapmpF3/CapmpR3	588							
	BaompF2/BaompR2	474	+						+
	CaompF2/CaompR2	309							
	BaompF2/BaompR2	474	+						+
	CapmpF3/CapmpR3	588							

Çizelge 4.2. Primer çiftlerinin hassasiyet ve spesifiteleri (devam)

Organizma	Primer	Ürün büyüklüğü (bp)	Hassasiyet (kalıp DNA miktarı ng/µl)						Spesifite
			-1	-2	-3	-4	-5	-6	
<i>C. burnetii</i>	Cb1sF3/Cb1sR3	430	+	+	+				+
	Ba1sF2/Ba1sR2	304							
	Cb1sF3/Cb1sR3	430	+	+					+
	BaompF2/BaompR2	474							
	Cb1sF3/Cb1sR3	430	+	+					+
	LmhlyF1/LmhlyR1	526							
	Cb1sF3/Cb1sR3	430	+	+					+
	LmiapF1/LmiapR1	588							
	Cb1sF3/Cb1sR3	430	+	+					+
	CapmpF3/CapmpR3	588							
<i>C. abortus</i>	Cb1sF3/Cb1sR3	430	+	+	+				+
	CaompF2/CaompR2	309							
	CaompF2/CaompR2	309	+	+	+				+
	Ba1sF2/Ba1sR2	304							
	CapmpF3/CapmpR3	588	+	+					+
	Ba1sF2/Ba1sR2	304							
	CaompF2/CaompR2	309	+	+					+
	BaompF2/BaompR2	474							
	CapmpF3/CapmpR3	588	+	+	+				+
	BaompF2/BaompR2	474							
	CaompF2/CaompR2	309	+						+
	LmhlyF1/LmhlyR1	526							
	CaompF2/CaompR2	309	+						+
	LmiapF1/LmiapR1	588							
	CapmpF3/CapmpR3	588	+	+					+
	LmhlyF1/LmhlyR1	526							

Çizelge 4.2. Primer çiftlerinin hassasiyet ve spesifiteleri (devam)

Organizma	Primer	Ürün büyüklüğü (bp)	Hassasiyet (kalıp DNA miktarı ng/ul)						Spesifite
			-1	-2	-3	-4	-5	-6	
<i>L. monocytogenes</i>	BaisF2/BaisR2	304							
	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+	+				+
	BaisF2/BaisR2	304							
	LmiapF1/LmiapR1	588	+	+					+
	BaompF2/BaompR2	474							
	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+					+
	BaompF2/BaompR2	474							
	LmiapF1/LmiapR1	588	+	+	+				+
	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+					+
	Cb1sF3/Cb1sR3	430							
	LmiapF1/LmiapR1	588	+	+					+
	Cb1sF3/Cb1sR3	430							
	CaompF2/CaompR2	309	+						
	LmhlyF1/LmhlyR1	526							
	CaompF2/CaompR2	309							
	LmiapF1/LmiapR1	588	+	+					+
	CapmpF3/CapmpR3	588							
	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+					+

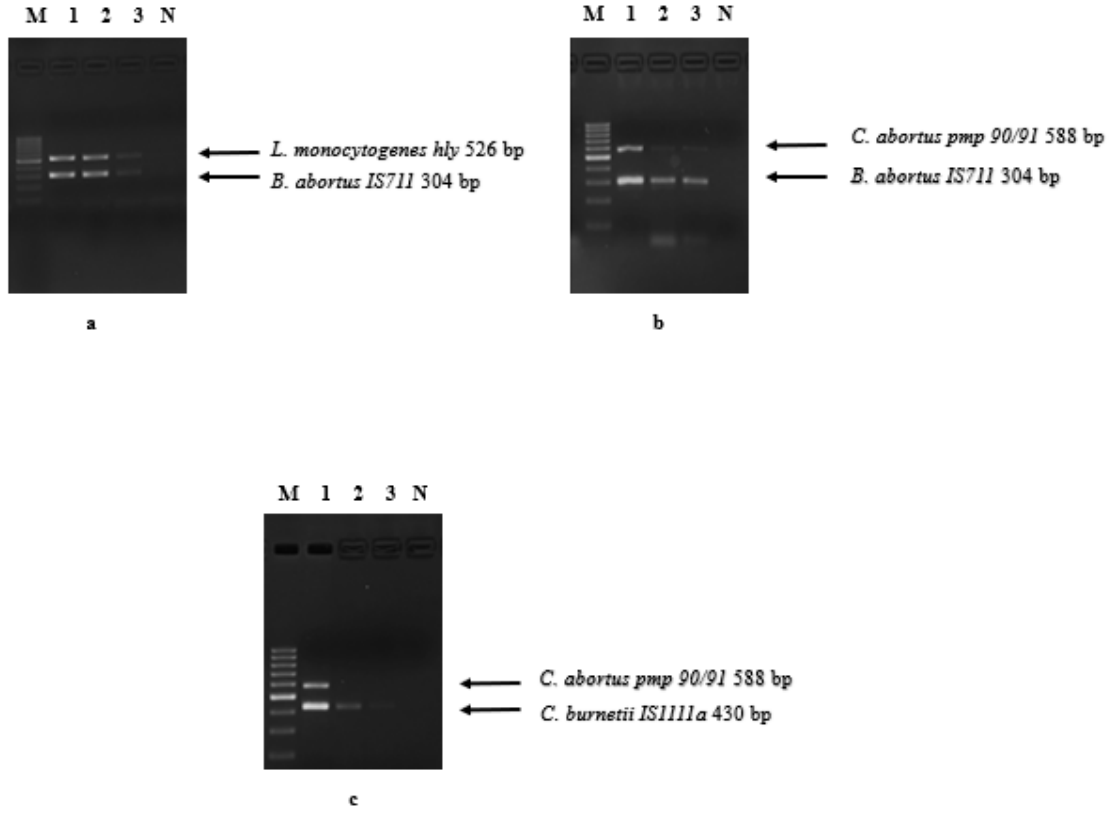
Buna göre primer çiftleri arasından hassasiyeti ve amplifikasyon oranı yüksek ve bant büyüklüğü bakımından yakınlık göstermeyen birer adedi mPZR aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. *Brucella abortus* için *IS711* genine ait 304 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen, *Coxiella burnetii* için *IS1111a* genine ait 430 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen, *Chlamydia abortus* için *pmp 90/91* genine ait 588 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen ve *Listeria monocytogenes hly* genine ait 526 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen primer çiftleri çalışmanın bu aşamasına dahil edilmiştir (Çizelge 4.3). Seçimi yapılan primerlerle multipleks PZR aşamalarında 10^{-3} 'e kadar seri sulandırımı yapılmış kalıp DNA'lar kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Seçilen primer çiftleri

Organizma	Hedef Gen	Oligonükleotid dizileri	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>Brucella abortus</i>	<i>IS711</i>	BaisF2: CTGCGAATAAAGCCAACACC BaisR2: TGAATGCGGTCAATGTTTTC	304
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>IS1111a</i>	CbisF3: TCGGCGTTTATTGGGTTG CbisR3: TTATCGGGCTATCGGCTTC	430
<i>Chlamydia abortus</i>	<i>pmp 90/91</i>	CapmpF3: CCGCTTCTTACAACCTTACCC CapmpR3: GGAGATACACACATTGCCTTCA	588
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LmhlyF1: TTAGCATTGATTTGCCAGGA LmhlyR1: GAGACAGATTTCCCACTTACGG	526

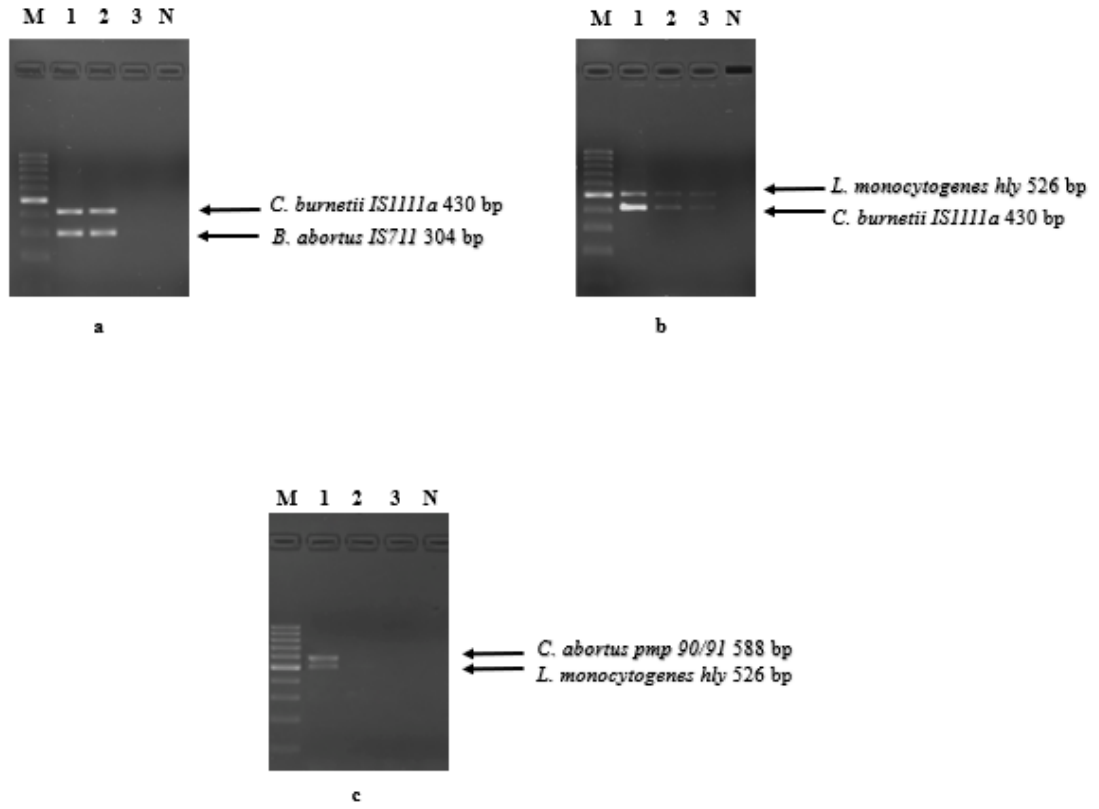
4.3.1. Dupleks PZR sonuçları

Dublex PZR aşamasında *Brucella abortus* *IS711* geni için 304 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen primer çifti ile hem *Listeria monocytogenes* *hly* geni için 526 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen primer çifti ve hem de *Chlamydia abortus* *pmp 90/91* geni için 588 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda belirgin bir amplifikasyon gözlenmiştir. Üçüncü dupleks çifti olarak *Coxiella burnetii* *IS1111a* geni için 430 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen primer çifti ile *Chlamydia abortus* *pmp 90/91* geni için 588 bp uzunluğundaki bölgeyi belirleyen primer çiftleri kullanıldığında en iyi bant belirginliği sağlanmıştır (Şekil 4.9 a-c).



Şekil 4.9. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan dublex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) *L. monocytogenes* hly geni için seçilen LmhlyF1/LmhlyR1 ve *B. abortus* IS711 geni için seçilen BaisF2/BaisR2 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi b) *C. abortus* pmp 90/91 geni için seçilen CapmpF3/CapmpR3 ve *B. abortus* IS711 geni için seçilen BaisF2/BaisR2 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi c) *C. abortus* pmp 90/91 geni için seçilen CapmpF3/CapmpR3 ve *C. burnetii* IS1111a geni için seçilen CbısF3/CbısR3 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-3: 10^{-1} ve 10^{-3} DNA)

IS1111a 430 bp (*Coxiella burnetii*)-IS711 304 bp (*Brucella abortus*), hly 526 bp (*Listeria monocytogenes*)- IS1111a 430 bp (*Coxiella burnetii*), hly 526 bp (*Listeria monocytogenes*)-pmp 90/91 588 bp (*Chlamydia abortus*) bölgelerini belirleyen primer çiftleri ile yapılan PZR sonucunda belirgin amplifikasyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.10 a- c).



Şekil 4.10. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan dublex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) *C. burnetii* IS1111a geni için seçilen CbısF3/CbısR3 ve *B. abortus* IS711 geni için seçilen BaısF2/BaısR2 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi b) *L. monocytogenes* hly geni için seçilen LmhlyF1/LmhlyR1 ve *C. burnetii* IS1111a geni için seçilen CbısF3/CbısR3 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi c) *C. abortus* CapmpF3/CapmpR3 ve *L. monocytogenes* hly geni için seçilen LmhlyF1/LmhlyR1 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-3: 10^{-1} ve 10^{-3} DNA)

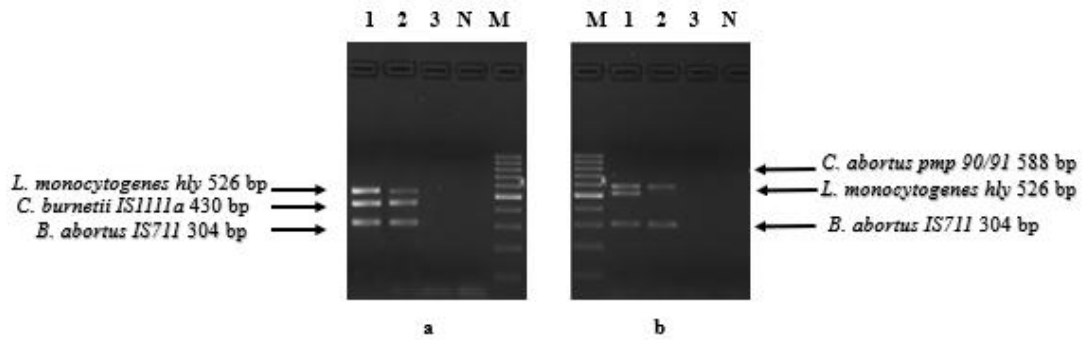
Şekil 4.9 ve 4.10'da görüldüğü üzere dört organizma için seçilen primer çifti kombinasyonları ile yapılan amplifikasyon çalışmalarında belirgin bantların gözlenmesi ve hedef bölge haricinde bant gözlenmemesi nedeniyle dupleks PZR aşamasında kullanılan primer çiftlerinin spesifitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tüm primer çifti kombinasyonlarının 10^{-1} sulandırım oranındaki kalıp DNA varlığında hassasiyetinin yüksek olduğu bulunmuştur.

Arıf ve arkadaşları (2020) *Brucella abortus* ve *Chlamydia abortus* tespitine yönelik düşük yapan koyunlardan alınan örneklerle çalışmış, BCSP31 ve ompA genlerine yönelik

özellikli primerlerin kullanıldığı çalışmada örneklerin %3,33'ü *C. abortus* tespit edilirken %96,66'sı *B. abortus* olarak pozitiflik vermiştir. Hein ve arkadaşları (2001) süt örneklerinde *L. monocytogenes* ve *Listeria innocua* tespitine yönelik *iap* geni kullanarak 175 ve 309 bp uzunluklarındaki kısımları amplifiye etmişlerdir. Araştırmacılar real-time PZR yönteminin iki mikroorganizmanın tespitinde kullanmanın avantajlı olduğunu belirtmişlerdir. Ruminantlarda düşüğe neden olan *Listeria monocytogenes* ve *Waddlia chondrophila*'nın aynı anda tespitine yönelik yapılan dublex PZR çalışmasında spesifik primerler kullanılarak *hly* ve 16S rRNA bölgelerinin varlığı belirlenmiştir. Sonuçların %100 spesifite ve duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiş, mPZR'nin etkenlerin eşzamanlı ve hızlı tespitinde önemli bir yere sahip olduğu belirtilmiştir (Barkallah ve ark., 2016).

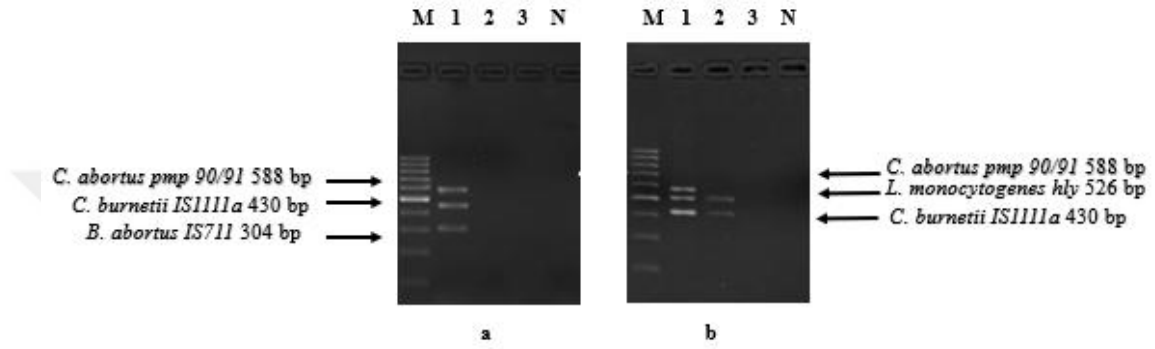
4.3.2. Triplex PZR sonuçları

B. abortus (IS711 304 bp), *L. monocytogenes* (*hly* 526 bp) ve *C. burnetii* (IS1111a 430 bp) (Şekil 4.11a) ve *B. abortus*, *L. monocytogenes* ve *C. abortus* (*pmp* 90/91 588 bp)'a ait primer çifti kombinasyonları ile yapılan tripleks PZR sonucunda belirgin bantlar gözlenmiştir. Her iki tripleks PZR kombinasyonunda 10^{-3} 'e kadar seri sulandırımı yapılmış DNA örnekleri kullanılmıştır. On katı sulandırılmış (10^{-1}) DNA konsantrasyonlarında primer çiftlerinin hassasiyetinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11b).



Şekil 4.11. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan triplex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) *L. monocytogenes* *hly* geni için seçilen LmhlyF1/LmhlyR1, *C. burnetii* IS1111a geni için seçilen Cb1sF3/Cb1sR3 ve *B. abortus* IS711 geni için seçilen BaisF2/BaisR2 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi b) *C. abortus* *pmp*90/91 geni için seçilen CapmpF3/CapmpR3, *L. monocytogenes* *hly* geni için seçilen LmhlyF1/LmhlyR1 ve *B. abortus* IS711 geni için seçilen BaisF2/BaisR2, primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-3: 10^{-1} ve 10^{-3} DNA)

Diğer tripleks PZR kombinasyonu *Chlamydia abortus* (*pmp 90/91* 588 bp), *Coxiella burnetii* (*IS1111a* 430 bp), *Brucella abortus* (*IS711* 304 bp)'a ait (Şekil 4.12a) ve *Chlamydia abortus*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes* (*hly* 3526 bp)'a ait (Şekil 4.12b)'e ait primer çiftleri kullanılarak yapılmış ve belirgin bantlar gözlenmiştir. Çalışma sonucunda her iki üçlü primer kombinasyonunun 10^{-1} sulandırım oranına sahip DNA konsantrasyonlarında yüksek hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Seçilen primer çiftleri ile çoğaltılan triplex PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi a) *C.abortus pmp90/91* geni için seçilen CapmpF3/CapmpR3, *C. burnetii IS1111a* geni için seçilen Cb1sF3/Cb1sR3 ve *B. abortus IS711* geni için seçilen Ba1sF2/Ba1sR2 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi b) *C. abortus pmp90/91* geni için seçilen CapmpF3/CapmpR3, *L. monocytogenes hly* geni için seçilen LmhlyF1/LmhlyR1 ve *C. burnetii IS1111a* geni için seçilen Cb1sF3/Cb1sR3 primer çiftleri ile çoğaltılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M: Marker, N: Negatif Kontrol, 1-3: 10⁻¹ ve 10⁻³ DNA)

Triplex mPZR'nin kullanıldığı sınırlı sayıda çalışmaya ulaşılmış olup, çalışmamız kapsamındaki dört organizmaya ait üçlü kombinasyonlu tripleks PZR ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır ve mPZR ile bu organizmaların tespiti ilk kez bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir. Heidari ve arkadaşları (2018) düşük yapmış koyun ve keçi fetüs kaynaklı örneklerde *C. abortus*, *C. burnetii* ve *Mycoplasma agalactiae* suşlarını mPZR ile tespit etmişlerdir. PZR aşamasında sırasıyla *pmp90/91*, *IS1111a* ve lipoprotein p80 gen bölgelerine ait spesifik primerler kullanılmıştır. Üç etkenin aynı anda tespitine yönelik yapılan mPZR çalışmasında *C. abortus*'un koyun ve keçilerde düşüğe neden olma potansiyelinin diğer etkenlere göre yüksek olduğu bildirilmiştir. *Coxiella* ve *Chlamydia* ile enfekte olduğu bilinen sürülerden alınmış klinik örneklerde *C.abortus*, *C. burnetii* ve *Chlamydophila pecorum*'un teşhisi amacıyla sırasıyla *pmp90/91*, *IS1111a* ve *CPC* gen

bölgelerinin varlığı mPZR ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda üç gen bölgesine ait amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezi ile tespit edilebildiği bildirilmiştir (Berri ve ark., 2009). *Listeria monocytogenes*'in *hly*, *Bacillus cereus*'un *NheB/C* ve *Campylobacter jejuni*'nin *C* gen bölgelerinin varlığı spesifik primerler kullanılarak belirlenmiş, üç gene ait amplifikasyon ürünlerinin bantları görüntülenmiştir. Araştırmacılar multipleks PZR'nin gıda zehirlenmesine yol açan bu mikroorganizmaların eşzamanlı tespitinde kullanılabilecek hızlı ve uygun maliyetli doğru bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır (Razei ve ark., 2017). Yine aynı şekilde Kumar ve arkadaşları (2009) birden fazla gen bölgesi üzerinden gıda kaynaklı *L. monocytogenes* (*hly* ve *iap*), *B. cereus* (*hblA*, *nheA* ve *cytK*) ve *Staphylococcus aureus*'un (*nuc* ve *entB*) tespiti amacıyla mPZR çalışmaları yapmış ve mPZR ile mikroorganizmaların tümünün tespit edilebildiğini bildirmişlerdir.

El-Sayed ve arkadaşları (2019) sığırlardan alınan klinik örneklerde *Brucella* spp. için *omp*, *Listeria monocytogenes* için *hlyA*, *Mycoplasma* spp. için 16S rRNA ve *Leptospira* için *lig* genlerine dört spesifik primer çifti kullanarak dört etkenin aynı anda tespitine yönelik çalışma yapmış, etkenlerin tamamının belirlenmesiyle mPZR'nin sığırlarda düşüğe neden olan mikrobiyal ajanların eş zamanlı tespitinde, hızlı ve güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. McDonald ve arkadaşları (2001) *Coxiella burnetii*'nin dahil olduğu dört farklı bakteri türüne ait farklı primer çiftlerini kullanarak mPZR yöntemi ile organizmaların teşhisini gerçekleştirmişlerdir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Farklı enfeksiyon etmenlerinin neden olduğu çok faktörlü bir klinik tablo olarak kabul edilen düşük olgusunun; fiziksel, toksik, endokrin ve çevresel nedenlerinin yanı sıra yaklaşık %90'ının bakteri, virüs, mantar ve protozoa enfeksiyonları kaynaklı olduğu kabul edilmektedir (Sharma ve ark., 2013). Hayvanlarda düşüğe neden olan enfeksiyon ajanların *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Campylobacter* spp. olduğu bildirilmiştir (El-Sayed ve ark., 2019; Sharma ve ark., 2013; Küçükkalem ve ark., 2013; Arıf ve ark., 2020). Dolayısıyla enfekte hayvan ve kontamine gıdalara maruz kalmış gebe kadınlarda da spontan düşükle ilgili ölümcül sistemik enfeksiyonlar görülebildiğinden, bu etmenlerin sadece hayvanlarda değil kadınlarda da düşüğe neden olduğu öngörülmektedir (Rohde ve ark., 2010; Mazze, 2015; Mateus ve ark., 2013).

Patojen *Brucella* türlerinin sebep olduğu Bruseloz dünya genelinde ekonomik kayıp yaşatmasının yanı sıra insanlarda birçok sağlık problemine neden olan zoonotik bir hastalıktır (Wang ve ark., 2014; Romero ve ark., 1995; Nimri, 2003; Sharma ve ark., 2013). Dünya Sağlık Örgütü tarafından her yıl yarım milyon yeni Bruselloz vakası rapor edilmekle birlikte, hastalığın klinik tablosunun değişkenlik göstermesi, teşhisinin doğru yapılamaması, doğru ve net vaka sayısının beyan edilmemesi sebebiyle hastalığın insidans değeri gerçekleri yansıtmamaktadır (Nimri, 2003). *Brucella abortus* enfeksiyonu hamile kadınlarda fetal, maternal/neonatal ölüm gibi gebelikte ciddi olumsuzluklara yol açmaktadır, ancak komplikasyon nedenleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Düşük ile ilişkisi olan *Brucella abortus*'un spesifik ve hızlı teşhisi gereken tedavinin yapılmasına, takiplerin gerçekleştirilmesine ve tekrarlarının erken tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle *B. abortus* tayininde PZR'nin serolojik yöntemlere göre hızlı, sensitif ve spesifik bir yöntem olduğu bilinmektedir (Morata ve ark., 1999; Wang ve ark., 2014; Nimri, 2003; Dahouk ve ark., 2003).

Coxiella burnetii için koyun ve keçiler en yaygın rezervuar olup enfeksiyonu ile erken doğum, spontan düşükle ilgili ölü doğuma neden olmaktadır. *Brucella abortus* gibi *Coxiella burnetii*'nin de hamilelikteki komplikasyon rolü açık değildir (Rey ve ark., 2000). Birçok çalışmada gebelikteki olumsuz sonuçların *Coxiella burnetii* seropozitifliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. *Coxiella burnetii*'nin hücre içi paraziti olması nedeniyle özel kültürasyon koşulları ve uzun kültürasyon süresi gerektirmektedir. Ayrıca serolojik

teşhisi uzun sürmekte ve enfeksiyonların %60'ının asemptomatik görülmesi nedeniyle teşhisi çoğunlukla geç yapılmaktadır (Baud ve ark., 2008).

Dünya çapında yaygın olarak koyun, keçi ve sığırlarda enzootik düşük ajanı olarak bilinen *Chlamydia abortus* birincil hedef olarak plasentaya yönelmektedir. Plazenta haricinde fetal dokular ve vajinal sekresyonlardan da organizma tanısı yapılabilmektedir. Zorunlu hücre içi paraziti olan *C. abortus* gebe olmayan hayvanlarda gebelik başlangıcına kadar lenfoid dokuda latent formda kalabilmekte ve gebelik esnasında veya düşük sonrasında serolojik ya da direkt yöntemlerle tespit edilebilmektedir (Nietfeld, 2011; Kılıç ve ark., 2010). Dolayısıyla gerek *C. abortus* gerekse *C. burnetii*'nin hücre içi paraziti olması sebebiyle hızlı ve güvenilir teşhisi önem kazanmaktadır.

Listeria monocytogenes'in neden olduğu Listeriosis, gıda kaynaklı bir hastalık olup semptomlarının şiddeti ve ölüm oranının yüksek olması nedeniyle ciddi bir sağlık sorunudur (Mazze, 2015). *Listeria monocytogenes*'in bağırsak mukozal bariyerini geçerek fetoplasental yapıyı enfekte etmesi sonucu düşük, ölü doğum, erken doğum, anne ve yenidoğan sepsisine neden olabildiği bilinmektedir (Baud ve Greub, 2011; Lamont ve ark., 2011; Bortolussi, 2008; Jackson ve ark., 2010). *Listeria monocytogenes* teşhisinde kullanılan serolojik testlerin diğer gram pozitif bakteriler ile çapraz reaksiyon verebilmesi nedeniyle güvenilirliği düşük olduğundan moleküler tabanlı analizler tercih edilmektedir (Allerberger, 2003).

Özel laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duyulması, laboratuvar kaynaklı enfeksiyonların önüne geçilmesi, mesleki risk teşkil etmesi, özellikle hücre içi parazitlerin özel kültürasyon koşulları ve uzun süre gerektirmesi, geleneksel kültür yöntemiyle tanımlamanın altın standart olmasına rağmen nazlı ve yavaş gelişme gösteren mikroorganizmaların zor izole edilmesi, serolojik veya biyokimyasal yöntemlerin hatalı sonuç verme olasılığının yüksek olması nedeniyle gebelikte olumsuz sonuçlarına neden olduğu bilinen bu mikroorganizmaların çoğu zaman tespit edilmesi güç olmaktadır. Dolayısıyla bu tür organizmaların daha hassas ve spesifik teşhisini sağlayan moleküler yöntemler öne çıkmaktadır (Saytekin ve Ak, 2018; Bricker, 2002; Baud ve ark., 2008). Doğrudan klinik materyallerden cins/tür düzeyinde tanımlama yapılması ve geleneksel yöntemlerdeki güçlük ve dezavantajları ortadan kaldırması nedeniyle PZR tercih edilen bir moleküler yöntemdir. Son yıllarda moleküler tanı yöntemlerinde ilerlemeler

kaydedilmiş, PZR tabanlı testlerin geleneksel yöntemlerden daha hızlı ve daha hassas olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Saytekin ve Ak, 2018; Bricker, 2002).

Farklı etmenlerin benzer semptomlarla seyreden hastalıklara neden olması, hastalığa sebep olduğu düşünülen tüm etmenlerin değerlendirmeye alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Her bir etkenin tek tek araştırılması zor, zaman alıcı ve yüksek maliyete neden olmakla birlikte, biyogüvenlik uygulama zorlukları, uzman personel ve teknik gereksinimlerin yanı sıra enfeksiyonun akut döneminde yanlış pozitiflik verme durumlarından dolayı çoklu analiz olanağı sağlayan moleküler metotların tercih edilmesine sebep olmaktadır (Klee ve ark., 2006; El-Sayed ve ark., 2019; Navarro ve ark. 2009). Dolayısıyla multipleks PZR; aynı anda birden fazla hastalığın tanısında, aynı etmenin farklı özelliklerinin belirlenmesinde ya da birden fazla etmenin tiplendirilmesinde yaygın kullanımı yönünden öne çıkmaya başlamıştır.

Tez çalışması kapsamında kadınlarda spontan düşük etmeni olduğu düşünülen *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* ve *Listeria monocytogenes*'in aynı anda tespitine yönelik mPZR çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla her bir organizma için iki spesifik gen bölgesine ait primerler dizayn edilerek simpleks ve mPZR çalışmaları ile primerlerin hassasiyet ve spesifiteleri kalitatif olarak belirlenmiştir. Tasarımı yapılan primerler ilk kez bu çalışma kapsamında kullanılmış olup, yapılan simpleks/multipleks PZR çalışmaları ile hedeflenen ürünlerin amplifikasyonu sağlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında her bir organizmaya ait bir gen için minimum üç primer çifti kullanılarak 10^{-6} oranına kadar ondalık düzende seyreltilmiş kalıp DNA konsantrasyonlarında simpleks PZR yapılarak en yüksek amplifikasyon ürünü gözlenen her bir gen bölgesi için birer primer seçimi yapılmıştır (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1. Her bir organizma için her bir gen bölgesine ait primerlerin seçimi (amplifikasyon görülmeyen primer çiftleri dahil edilmemiştir)

Organizma	Gen Bölgesi	Primer	Ürün büyüklüğü (bp)	Hassasiyet (kalıp DNA miktarı ng/μl)					
				-1	-2	-3	-4	-5	-6
<i>B. abortus</i>	IS711	BaisF1/BaisR1	446	+	+	+	+		
		BaisF2/BaisR2*	304	+	+	+	+	+	
		BaisF3/BaisR3	580	+	+	+			
	omp2b	BaompF2/BaompR2	474	+	+	+			
		BaompF3/BaompR3	371	+	+	+			
<i>C. burnetii</i>	com 1	Cbcom1F1/Cbcom1R1	442	+	+				
		Cbcom1F2/Cbcom1R2	274	+					
		Cbcom1F3/Cbcom1R3	360	+	+	+			
	IS1111a	CbisF1/CbisR1	335	+	+	+	+		
		CbisF2/CbisR2	337	+	+	+	+		
		CbisF3/CbisR3*	430	+	+	+	+	+	
<i>C. abortus</i>	ompA	CaompF1/CaompR1	165	+	+				
		CaompF2/CaompR2	309	+	+				
		CaompF3/CaompR3	249	+					
	pmp 90/91	CapmpF1/CapmpR1	227	+					
		CapmpF3/CapmpR3*	588	+	+	+			
<i>L. monocytogenes</i>	hly	LmhlyF1/LmhlyR1*	526	+	+	+	+		
		LmhlyF2/LmhlyR2	224	+	+				
	iap	LmiapF1/LmiapR1	588	+	+	+	+		
		LmiapF2/LmiapR2	320	+	+	+			
		LmiapF3/LmiapR3	300	+	+	+			

* Bir sonraki çalışma için seçimi yapılan primer çiftleri

Dört bakteri için seçilen sekiz primer çifti ve bir organizmaya ait kalıp DNA sabit tutulduğu PZR çalışmasında diğer organizmalar için belirlenen primer çiftleri ile çapraz kombinasyonlar yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda hassasiyet, spesifite ve ürün oranı yönünden yüksek sonuç veren ve ayrıca bant büyüklüğü yönünden yakınlık göstermeyen primer çiftleri belirlenmiş olup multipleks PZR aşamasına geçilmiştir. Seçilen primer çiftleri ile yapılan PZR kombinasyonlarında hedeflenen bölge haricinde bir ürünün gözlenmemesi ve 10^{-2} - 10^{-3} oranında seyreltilmiş DNA varlığında amplifikasyonun

gerçekleşmesi nedeniyle primerlerin hassasiyetinin ve spesifitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

Multipleks PZR, dubleks ve tripleks aşamalarından oluşmaktadır. Dubleks PZR çalışmalarında ikişerli olarak her bir organizmaya ait üç farklı seyreltme oranına sahip kalıp DNA'lar ile birlikte seçimi yapılan primer çiftleri eşleştirilerek amplifikasyonları yapılmış ve tüm kombinasyonlarda 10^{-1} seyreltme oranına sahip kalıp DNA'da yüksek hassasiyet ve spesifite tespit edilmiştir (Çizelge 5.2)

Çizelge 5.2. Dubleks PZR aşamasındaki hassasiyet ve spesifite

Organizma	Gen Bölgesi	Primer	Ürün büyüklüğü (bp)	Hassasiyet (kalıp DNA miktarı ng/μl)			Spesifite
				-1	-2	-3	
<i>B. abortus</i>	<i>IS711</i>	BaisF2/BaisR2	304	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+	+	+
<i>B. abortus</i>	<i>IS711</i>	BaisF2/BaisR2	304	+	+	+	+
<i>C. abortus</i>	<i>pmp 90/91</i>	CapmpF3/CapmpR3	588	+	+	+	+
<i>C. burnetii</i>	<i>IS1111a</i>	CbisF3/CbisR3	430	+	+	+	+
<i>C. abortus</i>	<i>pmp 90/91</i>	CapmpF3/CapmpR3	588	+			+
<i>B. abortus</i>	<i>IS711</i>	BaisF2/BaisR2	304	+	+		+
<i>C. burnetii</i>	<i>IS1111a</i>	CbisF3/CbisR3	430	+	+		+
<i>C. burnetii</i>	<i>IS1111a</i>	CbisF3/CbisR3	430	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+	+	+
<i>C. abortus</i>	<i>pmp 90/91</i>	CapmpF3/CapmpR3	588	+			+
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+			+

Tripleks PZR aşamasında üçerli gruplandırılan mikroorganizmalara ait azalan konsantrasyonlara (10^{-1} - 10^{-3}) sahip kalıp DNA'lar ile birlikte primer çiftleri eşleştirilerek amplifikasyon yapılmıştır. Tüm üçerli kombinasyonlarda 10^{-1} seyreltme oranına sahip kalıp DNA varlığında hassasiyet ve sensitivitenin yüksek olduğu amplifikasyon gerçekleşmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3. Tripleks PZR aşamasındaki hassasiyet ve spesifite

Organizma	Gen Bölgesi	Primer	Ürün büyüklüğü (bp)	Hassasiyet (kalıp DNA miktarı ng/ul)			Spesifite
				-1	-2	-3	
<i>B. abortus</i>	<i>IS711</i>	BaisF2/BaisR2	304	+	+		+
<i>C. burnetii</i>	<i>IS1111a</i>	CbisF3/CbisR3	430	+	+		+
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+		+
<i>B. abortus</i>	<i>IS711</i>	BaisF2/BaisR2	304	+	+		+
<i>C. abortus</i>	<i>pmp 90/91</i>	CapmpF3/CapmpR3	588	+	+		+
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+			+
<i>B. abortus</i>	<i>IS711</i>	BaisF2/BaisR2	304	+			+
<i>C. burnetii</i>	<i>IS1111a</i>	CbisF3/CbisR3	430	+			+
<i>C. abortus</i>	<i>pmp 90/91</i>	CapmpF3/CapmpR3	588	+			+
<i>C. burnetii</i>	<i>IS711</i>	CbisF3/CbisR3	430	+	+		+
<i>C. abortus</i>	<i>IS1111a</i>	CapmpF3/CapmpR3	588	+			+
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LmhlyF1/LmhlyR1	526	+	+		+

Çalışmamız kapsamında yapılan mPZR sonuçları tek yönlü yapılan simpleks PZR sonuçları ile yüksek oranda uyum göstermiştir. Düşük etmeni olabilen dört mikroorganizma için dizayn edilen spesifik primer çiftleri ile yapılan mPZR çalışmalarında hedeflenen sonuca ulaşılmıştır. Dolayısıyla bu mikroorganizmaların tripleks PZR ile tek aşamada tanısının yapılabileceği gösterilmiştir. Multipleks PZR çalışmalarının zaman, maliyet, spesifite ve doğruluk yönünden avantaj sağlayacağı açıktır. Rutin klinik çalışmalarda birden fazla mikrobiyal etmenin aynı anda tespitiye yönelik moleküler tabanlı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle *B. abortus*, *C. burnetii*, *C. abortus* ve *L. monocytogenes*'e ait özgün gen bölgeleri hedef alınarak tasarlanan primerlerle geliştirilen mPZR protokolü ve tez kapsamında ulaşılan tanımlama sonuçlarının bilimsel çalışmalara, hızlı tanı kitlerinin geliştirilmesine ve halk sağlığına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışma ile primer hassasiyeti ve spesifitesi kalitatif olarak belirlenmiş olup kantitatif yorumlar için real time PZR boyutunda çalışma yapılması, çoklu etken sayısının arttırılmasına yönelik PZR tabanlı çalışmaların yapılması ve direkt doku materyali üzerinden tanı için hızlı PZR protokollerinin oluşturulması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ababneh, H.S., Ababneh, M.M., Hananeh, W.M., Alsheyab, F.M., Jawasreh, K.I., Al-Gharaibeh, M.A. and Ababneh, M.M., 2014. Molecular identification of chlamydial cause of abortion in small ruminants in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, 46: 1407-1412.
- Akça, D. ve Şahin, M., 2011. Kars Yöresi Sığırlarından Alınan Süt ve Vajinal Sıvı Örneklerinden *Listeria* Türlerinin Araştırılması. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 17(6): 987-993.
- Al Dahouk, S. and Nöckler, K., 2011. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 9(7): 833-845.
- Ali, S., Akhter, S., Neubauer, H., Melzer, F., Khan, I., Ali, Q. and Irfan, M., 2015. Serological, cultural, and molecular evidence of *Brucella* infection in small ruminants in Pakistan. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 9(5): 470-475.
- Ali, S., Akhter, S., Neubauer, H., Scherag, A., Kesselmeier, M., Melzer, F., Khan, I., El-Adawy, H., Azam, A., Qadeer, S. and Qurban, A., 2016. Brucellosis in pregnant women from Pakistan: an observational study. **BMC Infectious Diseases**, 16: 468.
- Allerberger, F., 2003. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 35: 183-189.
- Amin, A.S., 2003. Application of touchdown enzyme time release (TETR)-PCR for diagnosis of *Chlamydomydia abortus* infection. **Research in Veterinary Science**, 74: 213-217.
- Angelakis, E. and Raoult, D., 2010. Q fever. **Veterinary Microbiology**, 140: 297-309.
- Arif, E.D., Saeed, N.M. and Rachid, S.K., 2020. Isolation and Identification of *Chlamydia abortus* from Aborted Ewes in Sulaimani Province, Northern Iraq. **Polish Journal of Microbiology**, 69(1): 65-71.
- Barkallah, M., Gharbi, Y., Slima, A.B., Elleuch, F., Mallek, Z., Saad, R.B., Gautier, M., Gdoura, R. and Fendri, I., 2016. Simultaneous detection of *Waddlia chondrophila* and *Listeria monocytogenes* in aborted ruminant samples by real-time quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, 125: 64-69.
- Baud, D., Peter, O., Langel, C., Regan, L. and Greub, G., 2008. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and *Brucella abortus* among pregnant women. **Clinical Microbiology and Infection**, 15: 499-501.
- Baud, D. and Greub, G., 2011. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. **Clinical Microbiology and Infection**, 17: 1312-1322.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H. and Atlas, R.M., 1991. Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Methods and their Applications. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 26(3/4): 301-334. doi: 10.3109/10409239109114071
- Berri, M., Rekiki, A., Boumedine, K.S. and Rodolakis, A., 2009. Simultaneous differential detection of *Chlamydomydia abortus*, *Chlamydomydia pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. **BMC Microbiology**, 9: 130.
- Bortolussi, R., 2008. Listeriosis: a primer. **Canadian Medical Association Journal**, 179 (8).
- Bricker, B.J., 2002. PCR a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, 90: 435-446.

- Brom, R., Engelen, E., Roest, H.I., Hoek, W. and Vellema, P., 2015. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. **Veterinary Microbiology**, 181: 119-129.
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. and Wagner, M., 1999. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. **Journal of Microbiological Methods**, 65(10): 4688-4692.
- Campos-Hernández, E., Vázquez-Chagoyán, J.C., Salem, A.Z., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Escalante-Ochoa, C., López-Heydeck, S.M. and de Oca-Jiménez, R.M., 2014. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. **Tropical Animal Health and Production**, 46: 919-924.
- Carcopino, X., Raoult, D., Bretelle, F., Boubli, L. and Stein, A., 2009. Q fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. **New York Academy of Sciences**, 1166: 79-89.
- Cengiz, A.T., 1999. Hastane infeksiyonlarına yol açan bakteriler. (Ş. Ustaçelebi, Editör), In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. **Güneş Kitabevi**; ISBN: 975-7467-77-4, p: 399-407, Ankara.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. and Caskey, C.T., 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, 16(23): 11141-11156.
- Christopher, S., Umapathy, B.L. and Ravikumar, K.L., 2010. Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. **Journal of Laboratory Physicians**, 2(2): 55-60.
- Corbel, M.J. and Banai, M., 2006. The Proteobacteria. (J.T., Staley, D.J., Brenner, N.R., Krieg, Editör), In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria. **Springer**; ISBN: 978-0-387-28022-6, p: 370-386, New York.
- Cumbassá, A., Barahona, M.J., Cunha, M.V., Azórin, B., Fonseca, C., Rosalino, L.M., Tilburg, J., Hagen, F., Santos, A.S. and Botelho, A., 2015. *Coxiella burnetii* DNA detected in domestic ruminants and wildlife from Portugal. **Veterinary Microbiology**, 180: 136-141.
- De la Rosa Zariñana, A.E., Crosby-Galván, M.M., Ramírez-Guzmán, M.E., Hernández-Sánchez, D. and Mata-Espinoza, M.A., 2018. Standardization of PCR technique for detecting *Listeria monocytogenes* in chicken, beef and pork. **Ecosistemas y Recursos Agropecuarios**, 5, 13.
- Devrim, A.K. ve Kaya, N., 2004. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 10(2): 209-214.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. and Dveksler, G.S., 1993. General Concepts for PCR Primer Design. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 3: 30-37.
- Elfaki, M.G., Uz-Zaman, T., Al-Hokail, A.A. and Nakeeb, S.M., 2005. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 53: 1-7.
- El-Mahallawy, H.S., Kelly, P., Zhang, J., Yang, Y., Wei, L., Tian, L., Fan, W., Zhang, Z. and Wang, C., 2016. Serological and molecular evidence of *Coxiella burnetii* in samples from humans and animals in China. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, 23(1): 87-91.
- El-Sayed, O.M., Moustafa, A.E., Abdeen, E. and Amin, A.S., 2019. Simultaneous Detection of *Brucella*, *Leptospira*, *Mycoplasma* and *Listeria* Species by Multiplex-PCR. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, 61(2): 52-57.

- Everett, K.D., Bush, R.M. and Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 49: 415-440.
- Eyigör, M., Gültekin, B., Telli, M., Odabaşı, A.R., Yüksel, H., Demircan Sezer, S. ve Aydın N., 2013. Düşük Yapmış Kadınlarda ve Eşlerinde *Coxiella burnetii* Prevalansının Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. **Mikrobiyoloji Bülteni**, 47(2): 324-331.
- Fitch, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Adams, L.G., 1989. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, 57(11): 3281-3291.
- Fournier, P.E. and Raoult, D., 2003. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(11): 5094-5098.
- Garshasbi, M., Ramazani, A., Sorouri, R., Javani, S. and Moradi, S., 2014. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(2): 533-538.
- Ghaoui, H., Bitam, I., Ait-Oudhia, K., Achour, N., Saad-Djaballah, A., Saadnia, F.Z., Kedjour, S. and Fournier, P.E., 2018. *Coxiella burnetii* infection with women's febrile spontaneous abortion reported in Algiers. **New Microbes and New Infections**, 26: 8-14.
- Giakoumelou, S., Wheelhouse, N., Cuschieri, K., Entrican, G., Howie, S.E. and Horne A.W., 2016. The role of infection in miscarriage. **Human Reproduction Update**, 22(1): 116-133.
- Glynn, M.K. and Lynn, T.V., 2008. Brucellosis. **Vet. Med. Today: Zoonosis Update**, 233(6): 900-908.
- Güler, L., Hadımlı, H., Erganiş, O., Ateş, M., Ok, Ü. ve Gündüz, K., 2006. Field evaluation of a PCR for the diagnosis of chlamydial abortion in sheep. **Veterinary Record**, 159: 742-745.
- Günaydın, E., Müştak, H.K., Sareyyüpoğlu, B. ve Ata, Z., 2015. PCR Detection of *Coxiella burnetii* in Fetal Abomasal Contents of Ruminants. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 21(1): 69-73.
- Gürbilek, S.E., Keskin, O., Yiğın, A. ve Tel, O.Y., 2018. Ruminant Abortus Vakalarında *Coxiella burnetii*'nin Real Time PCR ile Araştırılması. **Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 7(1): 79-83.
- Hage, E., Mpamugo, O., Ohai, C., Sapkota, S., Swift, C., Wooldridge, D. and Amar, C.F., 2014. Identification of six *Listeria* species by real-time PCR assay. **Letters in Applied Microbiology**, 58: 535-540.
- Haidar-Ahmad, N., Kissoyan, K.A., Fadlallah, S.M., El-Hajj, R., Saleh, M., Ghosn, N. and Matar, G.M., 2016. Genotypic and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* recovered from food items in Lebanon. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 10(7): 712-717.
- Hansen, M.S., Rodolakis, A., Cochonneau, D., Agger, J.F., Christoffersen, A., Jensen, T.K. and Agerholm, J.S., 2011. *Coxiella burnetii* associated placental lesions and infection level in parturient cows. **The Veterinary Journal**, 190: 135-139.
- Heidari, S., Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Ansari-Lari, M., Masoudian, M. and Eraghi, V., 2018. Molecular detection of *Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetii*, and

- Mycoplasma agalactiae* in small ruminants aborted fetuses in southern Iran. **Tropical Animal Health and Production**, 50: 779-785.
- Heidarzadeh, S., Dallal, M.M., Pourmand, M.R., Pirjani, R., Foroushani, A.R., Noori, M. and Naseri, A.B., 2018. Prevalence, antimicrobial susceptibility, serotyping and virulence genes screening of *Listeria monocytogenes* strains at a tertiary care hospital in Tehran, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, 10(5): 307-313.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E. and Wagner, M., 2001. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. **Research in Microbiology**, 152: 37-46.
- Heinzein, R.A. and Samuel, J.E., 2006. The genus coxiella. (M., Dworkin, S., Falkow, E., Rosenberg, K.H., Schleifer, E., Stackebrandt, Editor), In: The Prokaryotes Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. **Springer**; ISBN: 978-0-387-30745-9, p: 529-546, New York.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. and Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR-critical parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, 23(3): 504-511.
- Herman, L. and Ridder H., 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, 2099-2101.
- Howe, G.B., Loveless, B.M., Norwood, D., Craw, P., Waag, D., England, M., Lowe, R.L., Courtney, B.C., Pitt, M.L. and Kulesh, D.A., 2009. Real-time PCR for the early detection and quantification of *Coxiella burnetii* as an alternative to the murine bioassay. **Molecular and Cellular Probes**, 23: 127-131.
- Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A., 2007. Simultaneous detection of the Genus *Brucella* by combinatorial PCR. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 60: 137-139.
- Jackson, K.A., Iwamoto, M. and Swerdlow, D., 2010. Pregnancy-associated listeriosis. **Epidemiology and Infection**, 138: 1503-1509.
- Jamshidi, M., Jahromi, A.S., Davoodian, P., Amirian, M., Zangeneh, M. and Jadcareh, F., 2008. Seropositivity for *Listeria monocytogenes* in women with spontaneous abortion: A Case-control study in Iran. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, 48(1): 46-48.
- Kahya, S., Buyukcangaz, E. ve Carlı, K.T., 2013. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. **Bursa Uludağ Üniversitesi Journal of Research in Veterinary Medicine**, 32(1): 31-38.
- Karcaaltıncaba, D., Sencan, I., Kandemir, O., Guven-Guvendag, E.S. ve Yalvac, S., 2010. Does brucellosis in human pregnancy increase abortion risk? Presentation of two cases and review of literature. **The Journal of Obstetrics & Gynecology Research**, 36(2): 418-423.
- Kaur, S., Malik, S.V., Vaidya, V.M. and Barbuddhe, S.B., 2007. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, 103: 1889-1896.
- Khan, M.Y., Mah, M.W. and Memish, Z.A., 2001. Brucellosis in Pregnant Women. **Clinical Infectious Diseases**, 32: 1172-1177.
- Khelef, N., Lecuit, M., Buchrieser, C., Cabanes, D., Dussurget, O. and Cossart, P., 2006. *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. (S., Falkow, E., Rosenberg, K.H., Schleifer, E., Stackebrandt, Editor), In: The Prokaryotes Vol. 4: Bacteria:

- Firmicutes, Cyanobacteria. **Springer**; ISBN: 978-0-387-25494-4, p: 404-479, New York.
- Kılıç, A., Kalender, H. ve Muz, A., 2010. Atık Sığır Fetuslarında *Chlamydophila abortus*'un Mikrobiyolojik Kültür ve PZR ile Saptanması. **Fırat Üniversitesi Sağ. Bil. Vet. Derg.**, 24 (3): 129-132.
- Kılıç, A., 2017. Koyun ve Keçi Sütlerinde *Coxiella burnetii* Varlığının PCR ile Araştırılması. **Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.**, 12(2): 152-156.
- Kiss, R., Tirczka, T., Szita, G., Bernath, S. and Csiko, G., 2006. *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. **International Journal of Food Microbiology**, 112: 71-74.
- Klaasen, M., Roest, H-J., van der Hoek, W., Goossens, B., Secka, A. and Stegeman, A., 2014. *Coxiella burnetii* Seroprevalence in Small Ruminants in The Gambia. **PLOS ONE**, 9(1): e85424. doi:10.1371/journal.pone.0085424
- Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G. and Appel, B., 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. **BMC Microbiology**, 6: 2.
- Kumar, T.D., Murali, H.S. and Batra, H.V., 2009. Simultaneous detection of pathogenic *B. cereus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* by multiplex PCR. **Indian Journal of Microbiology**, 49: 283-289.
- Küçükkalem, Ö.F., Cengiz, S., Altun, S.K. ve Yıldırım, M., 2013. Erzurum İlinde Sığır Abortlarında *Coxiella burnetii*'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi. **Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi**, 8(3): 224-228.
- Lamont, R.F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J.P., Vaisbuch, E., Kim, S.K., Uldbjerg, N. and Romero, R., 2011. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. **Journal of Perinatal Medicine**, 39: 227-236.
- Langley, J.M., Marrie, T.J., LeBlanc, J.C., Almudevar, A., Resch, L. and Raoult, D., 2003. *Coxiella burnetii* seropositivity in parturient women is associated with adverse pregnancy outcomes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 189: 228-232.
- Laroucau, K., Souriau, A. and Rodolakis, A., 2001. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using *pmp* genes. **Veterinary Microbiology**, 82: 155-164.
- Le Monnier, A., Abachin, E., Beretti, J.L., Berche, P. and Kayal, S., 2011. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis by Real-Time PCR for the *hly* Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 49(1): 3917-3923.
- Leal-Klevezas, D.S, Martinez-Vazouez, I.O, Lopez-Merino, A. and Martinez-Soriano, J.P., 1995. Single-Step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, 33 (12): 3087-3090.
- Leber, A., Zenclussen, M.L., Teles, A., Brachwitz, N., Casalis, P., El-Mousleh, T., Jensen, F., Woidacki, K. and Zenclussen, A.C., 2011. Pregnancy: tolerance and suppression of immune responses. **Methods in Molecular Biology**, 677: 397-417.
- Li, Z., Cao, X., Fu, B., Chao, Y., Cai, J. and Zhou J., 2015. Identification and Characterization of *Chlamydia abortus* Isolates from Yaks in Qinghai, China. **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 658519, 6 pages. <https://doi.org/10.1155/2015/658519>
- Livingstone, M., Wheelhouse, N., Maley, S.W. and Longbottom, D., 2009. Molecular detection of *Chlamydophila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. **Veterinary Microbiolog**, 135: 134-141.

- Lockhart, M.G., Graves, S.R., Banazis, M.J., Fenwick, S.G. and Stenos, J., 2011. A comparison of methods for extracting DNA from *Coxiella burnetii* as measured by a duplex qPCR assay. **Letters in Applied Microbiology**, 52: 514-520.
- Lotfollahi, L., Chaharbalesh, A., Rezaee, M.A. and Hasani, A., 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility and multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods and livestock in Iran. **Microbial Pathogenesis**, 107: 425-429.
- Lozano, M.S., Bruno, J.F., Castro, R.H., Contreras, C.B., Medina, R.D., Espinosa, J.F., Echeverry, A. and Brashears, M.M., 2013. Detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* in beef at points of sale in Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, 4(1): 107-115.
- Lynch, J.R. and Brown, J.M., 1990. The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. **Journal of Medical Genetics**, 27: 2-7.
- Mancilla, M., Ulloa, M., López-Goñi, I., Moriyón, I. and Zárraga, M., 2011. Identification of new *IS711* insertion sites in *Brucella abortus* field isolates, **BMC Microbiology**, 11: 176.
- Markoulatos, P., Siafakas, N. and Moncany M., 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 16: 47-51.
- Marushchak, L.V., Deriabin, O.N., Dedok, L., Volosyanko, E. and Garcavenko, T., 2020. Development of a PCR Kit for Detection of *Coxiella burnetii* in Ukraine, **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 20(2), 100-106. doi: 10.1089/vbz.2019.2518
- Matar, G.M., Khneisser, I.A. and Abdeelnor, A.M., 1996. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, 34(2): 477-478.
- Mateus, T., Silva, J., Maia, R.L. and Teixeira, P., 2013. Listeriosis during Pregnancy: A Public Health Concern. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, Article ID 851712, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/851712>
- Maurin, M. and Raoult, D., 1999. Q fever. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4): 518-553.
- Mazza, R., Piras, F., Ladu, D., Putzolu, M., Consolati, S.G. and Mazzette, R., 2015. Identification of *Listeria* spp. Strains isolated from meat products and meat production plants by multiplex polymerase chain reaction. **Italian Journal of Food Safety**, 4: 5498.
- McDonald, R., Cao, T. and Borschel, R., 2001. Multiplexing for the detection of multiple biowarfare agent shows promise in the field. **Military Medicine**, 166(3): 237-239.
- Meijer, A., Brandenburg, A., de Vries, J., Beentjes, J., Roholl, P. and Dercksen D., 2004. *Chlamydia abortus* infection in a pregnant woman associated with indirect contact with infected goats. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 23: 487-490.
- Mirnejad, R., Mohamadi, M., Piranfar, V., Mortazavi, S.M. and Kachuei, R., 2013. A duplex PCR for the rapid and simultaneous detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 453-456.
- Mirnejad, R., Jazi, F.M., Mostafaei, S. and Sedighi, M., 2017. Molecular investigation of virulence factors of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains isolated from clinical and non-clinical samples. **Microbial Pathogenesis**, 109: 8-14.
- Mitsushashi, M., 1996. Technical Report: Part 2. Basic Requirements for Designing Optimal PCR Primers. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 10: 285-293.

- Mook, P., Grant, K.A., Little, C.L., Kafatos, G. and Gillespie, I.A., 2010. Emergence of pregnancy-related listeriosis amongst ethnic minorities in England and Wales. **Euro Surveill**, 15(27): pii=19610.
- Morata, P., Queipo-Ortuño, M.I., Requera, J.M., García-Ordoñez, M.A., Pichardo, C. and Dios Colmenero, J., 1999. Posttreatment Follow-Up of Brusellosis by PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 37(12): 4163-4166.
- Morrell, E.L., Campero, C.M., Cantón, G.J., Odeón, A.C., Moore, D.P., Odriozola, E., Paolicchi, F. and Fiorentino, M.A., 2019. Current trends in bovine abortion in Argentina. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, 39(1): 12-19.
- Mullis K.B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, 264: 56-65.
- Navarro, J.A., Ortega, N., Buendia, A.J., Gallego, M.C., Martínez, C.M., Caro, M.R., Sánchez, J. and Salinas, J., 2009. Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. **Veterinary Record**, 165: 175-178.
- Nielsen, S.Y., Mølbak, K., Andersen, A.M., Henriksen, T.B., Kantsø, B., Krogfelt, K.A. and Hjøllund, N.H., 2013. Prevalence of *Coxiella burnetii* in women exposed to livestock animals, Denmark, 1996 to 2002. **Euro Surveill**, 18(28): pii=20528.
- Nietfeld, J.C., 2011. Chlamydial Infections in Small Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 17: 2.
- Nimri, L.F., 2003. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. **BMC Infectious Diseases**, 3: 5.
- Ogunmodede, F., Jones, J.L., Scheffel, J., Kirkland, E., Schulkin, J. and Lynfield, R., 2005. Listeriosis prevention knowledge among pregnant women in the USA. **Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology**, 13(1): 11-15.
- Oskam, C.L., Gofton, A.W., Greay, T.L., Yang, R., Doggett, S., Ryan, U.M. and Irwin, P.J., 2016. Molecular investigation into the presence of a *Coxiella* sp. in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Australia. **Veterinary Microbiology**, 201: 141-145.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J. and Sachse, K., 2010. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 33: 473-484.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. and Tsianos, E.V., 2006. The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Diseases**, 6: 91-99.
- Parker, N.R., Barralet, J.H. and Bell, A.M., 2006. Q fever. **Lancet**, 367: 679-688.
- Pishva, E., Salehi, R., Hoseini, A., Kargar, A., Taba, F.E. Hajiyan, M., Fadaei, J. and Ramezani, J., 2015. Molecular typing of *Brucella* species isolates from Human and livestock bloods in Isfahan province. **Advanced Biomedical Research**, 4: 104.
- Prakash, C., Kumar, B., Abhishek, Kumar, J., Joseph, B., Pandian, S.J., Sonawane, G.G., Chander, V., Singh, M.K. and Sharma, G.K., 2019. Detection of *Brucella* spp. in spiked clinical sample and bovine aborted foetal stomach contents by polymerase chain reaction. **International Journal of Chemical Studies**, 7(3): 4803-4807.
- Probert, W.S., Schrader, K.N., Khuong, N.Y., Bystrom, S.L. and Graves, M.H., 2004. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 1290-1293.

- Queipo-Ortuño, M.B., Morata, P., Ocón, P., Manchado, P. and Dios Colmenero, D., 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 35(11), 2927-2930.
- Quijada, S.G., Terán, B.M., Murias, P.S., Anitua, A.A., Cermeño, J.L. and Frías, A.B., 2012. Q fever and spontaneous abortion. **Clinical Microbiology and Infection**, 18: 533-538.
- Raoult, D., 1993. Treatment of Q fever. **Antimicrobial Agents Chemother**, 37(9): 1733-1736.
- Raoult, D., Fenollar, F. and Stein, A., 2002. Q fever during pregnancy. **Archives of Internal Medicine**, 162: 701-704.
- Raoult, D., Marrie, T.J. and Mege, J.L., 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. **Lancet Infectious Diseases**, 5: 219-226.
- Razei, A., Sorouri, R., Mousavi, S.L., Nazarian, S., Amani, J. and Aghamollaei, H., 2017. Presenting a rapid method for detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in food samples. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 20(9): 1050-1055.
- Reid, F., Oakeshott, P., Kerry, S.R., Hay, P.E. and Jensen, J.S., 2017. Chlamydia related bacteria (*Chlamydiales*) in early pregnancy: community-based cohort study. **Clinical Microbiology and Infection**, 23(2): 119.e9-119.e14.
- Rey, D., Obadia, Y., Tissot-Dupont, H. and Raoult, D., 2000. Seroprevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among pregnant women in South Eastern France. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 93(2): 151-156.
- Richtzenhain, L.J., Cortez, A., Heinemann, M.B., Soares, R.M., Sakamoto, S.M., Vasconcellos, S.A., Higa, Z.M., Scarcelli, E. and Genovez, M.E., 2002. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, 87: 139-147.
- Roberts, W., Grist, N.R. and Giroud, P., 1967. Human abortion associated with infection by ovine abortion agent. **British Medical Journal**, 4(5570): 37.
- Robertson, J.M. and Walsh-Weller, J., 1998. An Introduction to PCR Primer Design and Optimization of Amplification Reactions. **Forensic DNA Profiling Protocols**, 98: 121-154. doi: 10.1385/0-89603-443-7:121
- Rodolakis, A. and Mohamad, K.Y., 2010. Zoonotic potential of *Chlamydia*. **Veterinary Microbiology**, 140(3-4): 382-391.
- Rohde, G., Straube, E., Essig A., Reinhold, P. and Sachse, K., 2010. Chlamydial Zoonoses. **Deutsches Ärzteblatt International**, 107(10): 174-180.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M. and López-Goñi, I., 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(3), 615-617.
- Sareyyüpoğlu, B. ve Cantekin, Z., 2009. Use of a multiplex-polymerase chain reaction for detection of *Salmonella* and *Chlamydia psittaci* from caged birds. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 56(4): 269-273.
- Satei, E., Mirshahabi, H., Zeighami, H., Gholoobi, A. and Sadeghi, H., 2020. Molecular survey of *BCSP31* and *IS711* using PCR assays in detection of *Brucella* spp. in raw milk. **Meta Gene**, 24: 100683.
- Saytekin, A.M. ve Ak, S., 2018. Direct diagnosis of *Brucella* species through multiplex PCR formed by a new method. **Journal of Microbiological Methods**, 154: 86-94.
- Seleem, N.M., Boyle, M.S. and Sriranganathan N., 2010. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, 140: 392-398.

- Sharma, A., Deka, D., Agrawal, R. and Mitra, N.R, 2013. Development of a Multiplex PCR Assay for the detection of infectious causes of bovine Abortion. **Journal of Cell and Tissue Research**, 13(3): 3865-3870.
- Shetty, A., McLauchlin, J., Grant, K., O'Brien, D., Howard, T. and Davies, E.M., 2009. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. **Journal of Hospital Infection**, 72(4): 332-336.
- Sofian, M., Aghakhani, A., Velayati A.A., Banifazl, M., Eslamifar, A. and Ramezani A., 2008. Risk factors for human brucellosis in Iran: a case-control study. **International Journal of Infectious Diseases**, 12(2): 157-161.
- Soni, D.K., Singh, D.V. and Dubey, S.K., 2015. Pregnancy - associated human listeriosis: Virulence and genotypic analysis of *Listeria monocytogenes* from clinical samples. **Journal of Microbiology**, 53: 653-660.
- Stein, A. and Raoult, D., 1998. Q fever during pregnancy: a public, health problem in southern France. **Clinical Infectious Diseases**, 27(3): 592-596.
- Tian, M., Qu, J., Han, X., Ding, C., Wang, S., Peng, D. and Yu, S., 2014. Mechanism of Asp24 Upregulation in *Brucella abortus* Rough Mutant with a Disrupted O-Antigen Export System and Effect of Asp24 in Bacterial Intracellular Survival. **Infection and Immunity**, 82(7): 2840-2850.
- Tissot-Dupont, H., Vaillant, V., Rey, S. and Raoult, D., 2007. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. **Clinical Infectious Diseases**, 44(2): 232-237.
- Vaidya, V.M., Malik, S.V, Kaur, S., Kumar, S. and Barbuddhe, S.B., 2008. Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, 46(6): 2038-2044.
- Vilchez, G., Espinoza M., D'Onadio, G., Saona P. and Gotuzzo, E., 2015. Brucellosis in pregnancy: clinical aspects and obstetric outcomes. **International Journal of Infectious Diseases**, 38: 95-100.
- Volokhov, D., Rasooly, A., Chumakov, K. and Chizhikov, V., 2002. Identification of *Listeria* Species by Microarray-Based Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(12): 4720-4728.
- Wang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Bai, L., Zhao, Y., Liu, C., Ma, A. and Yu, H., 2014. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 13:31.
- Wiedmann, M., 2003. An integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. **Journal of Dairy Science**, 86(6): 1865-1875.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L., 2012. **BMC Bioinformatics**, 13: 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
- Young, E.J., 1991. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. **Reviews of Infectious Diseases**, 13(3): 359-372.
- Yu, W.L. and Nielsen, K., 2010. Review of detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. **Croatian Medical Journal**, 51(4): 306-13.
- Zahidi, J.M., Yong, T.B., Hashim, R., Noor, A.M., Hamzah, S.H. and Ahmad, N., 2015. Identification of *Brucella* spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 81(4): 227-233.

- Zamanian, M., Hashemi Tabar, G.R., Rad, M. and Haghparast, A., 2015. Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method, **Archives Iranian Medicine**, 18(1): 44-50.
- Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K. 1997. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein. **Microbiology and Immunology**, 41(11): 871-877.
- Zhang, G.Q., Nyugen, S.V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Kim, H.J., Fukudhi, H. and Hirai, K., 1998. Clinical Evaluation of a New PCR Assay for Detection of *Coxiella burnetii* in Human Serum Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(1): 77-80.

