(Mikrobiyol Bült, 29: 304-320, 1995)

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) TEKNOLOJİSİ VE MİKROBİYOLOJİDE KULLANIMI

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNOLOGY AND DIAGNOSTIC APPLICATIONS IN MICROBIOLOGY

Rıza DURMAZ*

Özet: PCR, polimeraz enzimini kullanarak özgül nükleik asit segmentinin arka arkaya in vitro koşullarda sentezlenmesidir. Bir tüp içerisine hedef nükleik asit, primerler, Taq DNA polimeraz, deoksi nükleotid trifosfatlar (dNTPs), Mg^{++}, tampon ve su konulduktan sonra sıra ile üç değişik ısıda "denaturation" (92-98 °C), "annealing" (37-75 °C) ve "extension" (70-74 °C) işlemleri ard arda tekrarlanarak hedef nükleik asit amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Yeni bir teknik olmasına karşın çok yaygın kullanım alanı bulmuştur. Enfeksiyon alanında; birçok bakteriyel, viral, paraziter ve fungal hastalıkların tanısında, antimikrobial direncin kısa sürede belirlenmesinde ve mikroorganizmaların genotipik olarak tiplendirilmesinde PCR teknolojisinden yararlanılmaktadır. Ayrıca bazı kanser ve genetik hastalıkların tanısında, adli tıpta suçluların belirlenmesinde ve babalık tayininde, transplantasyonda alıcı ve vericinin dokuları arasındaki uygunluğu belirlemede de bu teknik uygulamaya girmiştir.

Anahtar kelimeler: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).

Summary: In PCR, target nucleic acid, primers, Taq DNA polymerase, dNTPs, Mg^{++}, buffer and water are used for the synthesis of the desired nucleic acid sequence in cyclic fashion. A cycle consists of 3 steps, performed at three different temperature, which are denaturation (92-98 °C), annealing (37-70 °C) and extension (70-74 °C). Although a relatively new technique, PCR amplification has already found extensive application in the diagnosis of many bacterial, viral, fungal and parasitological diseases, rapid detection of antimicrobial resistance and genomic typing of microorganisms. In addition to those, PCR has been used in the diagnosis of certain cancer and genetic diseases, in forensic medicine to prove the guilt of suspects and to prove or disprove consanguinty between parents and children, in organ transplantation to compare donor and recipient HLA gene sequences. In this review article, the PCR method and its applications in microbiologic diagnosis were discussed.

Key words: Polymerase chain reaction (PCR).

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

Geliş Tarihi: 20.7.1994 Kabul Ediliş Tarihi: 30.3.1995

G İ R İ Ş

PCR, DNA Polimeraz enzimi kullanılarak özgül nükleik asit segmentinin in vitro koşullarda arka arkaya defalarca sentez edilmesidir. İlk defa A.B.D.'de Cetus Corporation'da çalışan Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlandı. Bu buluş Mullis'e 1993 Nobel ödülünü kazandırdı. İlk PCR uygulamalarında enzim olarak *Escherichia coli* DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmanı kullanılmıştır. Bu enzim yüksek ısıya dayanıksız olduğu için her siklusta denatürasyondan sonra ortalama yeniden konması gerekiyordu. Yapılan çalışmalarda *Thermus aquaticus*'dan yüksek sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz (Taq polymerase) elde edildi. Böylece hedef DNA, primerler ve gerekli diğer maddelerin bulunduğu reaksiyon tüpüne DNA polimeraz enzimi başlangıçta bir defa konduktan sonra, otomatize cihazlarla birkaç saat içinde milyonlarca DNA molekülü elde edilmiş oldu (1).

PCR ile AMPLİFİKASYON

Hedef nükleik asitin amplifikasyonu başlıca şu sistemlerle yapılabilmektedir (2):

1. Polymerase Chain Reaction (PCR).
2. Transcription-based Amplification System (TAS).
3. Self-sustaining Sequence Replication (3SR).
4. Strand Displacement Amplification (SDA).

Bu yazıda son üç yöntem hakkında kısaca tanımlayıcı bilgi verilecek, sonra amplifikasyonda yaygın olarak kullanılan PCR teknolojisi üzerinde durulacaktır.

Transcription-based amplification system (TAS): Yöntemin esası; in vitro transkripsiyonla amplifikasyon sağlamaktır. Bu sistemde her siklus iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada, *reverse transcriptase (RT)* enzimiyle örnekte bulunan herbir tek zincir RNA'nın komplementeri olan DNA sentezlenmektedir. İkinci aşamada ise, ısı ile denatürasyonu takiben tek zincir haline getirilen cDNA'nın *T7 RNA polymerase* enzimi ile in vitro transkripsiyonu sağlanmaktadır. Herbir cDNA'nın transkripsiyonu ile yaklaşık 40 kadar RNA oluşmakta ve bunlar bir sonraki siklusta yeni cDNA'ların oluşumu için kullanılmaktadır. Dört siklus sonunda, örnekte bulunan nükleik asit sayısı 2×10^6–5×10^6 kadar artmaktadır (2).

Self-sustained sequence replication system (3SR): TAS'ın modifikasyonu olan bu yöntemde bütün işlemler izotermal koşullarda gerçekleşmektedir. TAS'da uygulanan ısı ile denatürasyon işlemi yoktur. RNaz enzimi kullanılarak cDNA sentezi esnasında bir yandan da RNA'nın yıkımı gerçekleştirilmektedir. Böylece DNA-RNA hibridizasyonu engellenerek tek iplikli DNA oluşumu sağlanmakta ve yukarıda açıklandığı gibi bu cDNA'nın transkripsiyonu oluşmaktadır (2).

Strand displacement amplification (SDA): Çift sarmal DNA'nın denatürasyonundan sonra üç deoksinükleozid trifosfat ve deoksiadenozin 5-(alfa-thio)-trifosfat ile uygun primerler kullanılarak üzerinde *"restriction endonuclease site-specific nick"* bölgeleri

bulunan DNA'lar oluşturulmakta, sonra restriction enzimi ile DNA üzerinde kopmalar meydana getirilmektedir. Daha sonra DNA polymerase enzimi, kırılan zincirin kısa parçasının 3' ucundan başlayarak DNA sentezini yaparken, kopan DNA'ya ait uzun parçaların yer değiştirmesini sağlamaktadır. Yer değiştiren bu parçalar yeni reaksiyonların başlangıcında hedef DNA görevini üstlenmektedir. Kırılma, polimerizasyon, yer değiştirme işlemlerinden oluşan siklusun tekrarlanması ile amplifikasyon gerçekleşmektedir (2).

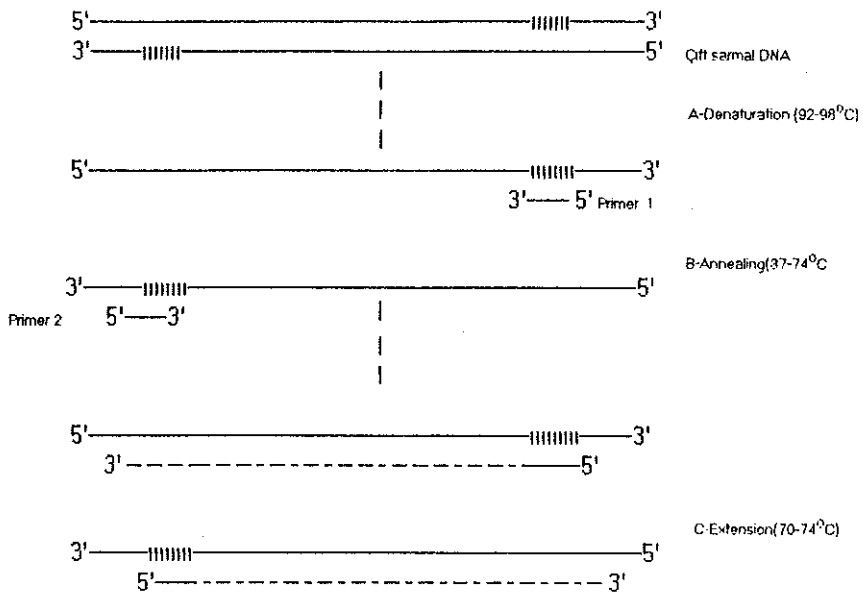
Polymerase Chain Reaction

PCR teknolojisinde birbirini izleyen üç işlem vardır. Bunlar; reaksiyon karışımının üç değişik ısıda sıra ile inkübe edilmesi ile gerçekleştirilir.

A-Denaturation: Çift sarmallı hedef DNA'nın iki iplikciğinin birbirinden ayrılması–92 ila 98 °C arasında gerçekleşir.

B-Annealing: Tek iplikcik haline getirilen hedef DNA moleküllerindeki özgül bölgeye primerlerin bağlanması, renatürasyon–37 ila 70 °C arasında gerçekleşir.

C-Extension: Hedef DNA ile hibridizasyon oluşturan primerlerin polimeraz enzimi ile 5'–3' yönünde uzatılması, yani DNA polimeraz enzimi tarafından primerlerin 3' ucuna yeni nükleotidlerin eklenmesi–70 ila 74 °C arasında gerçekleşir (Şekil 1).



Şekil 1
PCR teknolojisinde bulunan üç aşamanın şematik gösterilişi.

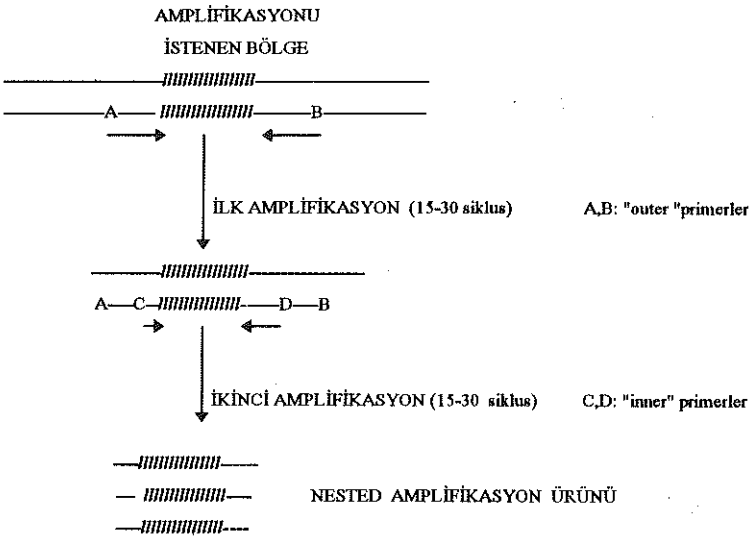
Bir tüp içerisine hedef DNA, primerler, ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz, dNTP'lar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Mg^{++} iyonları, tampon ve su konduktan sonra sıra ile "denaturation", "annealing" ve "extension" işlemleri ard arda tekrarlanarak hedef DNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Her siklus sonunda başlangıçta ortamda bulunan DNA sayısında iki kat artış olmaktadır. Böylece 20 siklus sonunda bir kalıp molekülden yaklaşık 2^{20} kadar DNA elde edilmektedir (1, 2).

Hedef olarak RNA kullanıldığında *reverse transcriptase* - PCR yöntemi ile amplifikasyon gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde ilk aşama olarak reaksiyon tüpüne dNTP'lar, anti-sense (downstream) primerler, RNaz inhibitörü, $MgCl_2$, tampon, su ve örnek konularak *reverse transcriptase* ile viral RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezlenmektedir. Sonra bu tüpe Taq DNA polimeraz enzimi, upstream (sense) primerler, PCR tamponu, uygun yoğunlukta $MgCl_2$ ve su konulmasıyla amplifikasyon gerçekleştirilmektedir (3). Son yıllarda RNA virusları ile ilgili PCR çalışmalarında *reverse transcriptase* ve DNA polimeraz aktivitelerinin her ikisine birlikte sahip olan Tth DNA polimeraz enzimi kullanılarak hedef RNA'nın amplifikasyonu mümkün olabilmektedir. *Thermus thermophilus*'dan elde edilen Tth DNA polimeraz enzimi yüksek sıcaklıkta $MnCl_2$ varlığında reverse transkriptaz aktivitesi gösterirken, $MnCl_2$'ün azaltılması ve $MgCl_2$'ün eklenmesi ile DNA polimeraz gibi etki göstermektedir (4).

PCR ile ilgili çalışmalarda diğer önemli aşama, lam üzerine tesbit edilen dokudaki enfekte hücrede bulunan hedef DNA'nın amplifikasyonu ve sonucun in situ hibridizasyon ile gösterilmesidir. Kısaca; lam üzerine doku veya hücreler konduktan sonra, havada kurutulur ve 105 °C'de 30 saniye bekletilir. % 2'lik paraformaldehitli fosfat tamponlu tuzlu su ile bir saat işleme alınır. 3 x 0.1M PBS (Phosphate buffer saline) ile bir kere, 1 x 0.1M PBS ile üç defa yıkanır. Proteinaz K enzimi (5 µg/ml) ile 55 °C'de iki saat muamele edildikten sonra, 96 °C'de iki dakika tutularak proteinaz K inaktive edilir. Lam su ile yıkanır ve havada kurutulur. Sonra lam üzerine amplifikasyon solüsyonu eklenir ve lam plastik kapakla kapatılır. Plastik kapağın etrafı tırnak ojesi ile çevrilir. Lam, otomatik "Thermal Cycler" üzerine konulur. Aluminyum foil ile kapatıldıktan sonra amplifikasyon başlatılır. Amplifikasyondan sonra lam absolü etil alkol içinde 3-5 dakika tutulur. Sonra 92 °C'de 30 saniye denatürasyon sağlanır ve 2 x SSC (Sodyum klorür + Sodyum sitrat) tamponu ile yıkanır. Bunu takiben özgül problarla *in situ* hibridizasyon yapılarak amplifikasyon sonucu gözlenir (5).

PCR teknolojisinde yapılan bir modifikasyonla *"nested"* amplifikasyon yöntemi uygulamaya girmiştir. Bu yöntemde ilk olarak "outer" primerler ile amplifikasyon yapılmaktadır (15-30 siklus). Sonra bu ilk amplifikasyon tüpünden alınan örnekteki DNA "inner" primerlerle amplifiye edilmektedir (15-30 siklus) (Şekil 2).

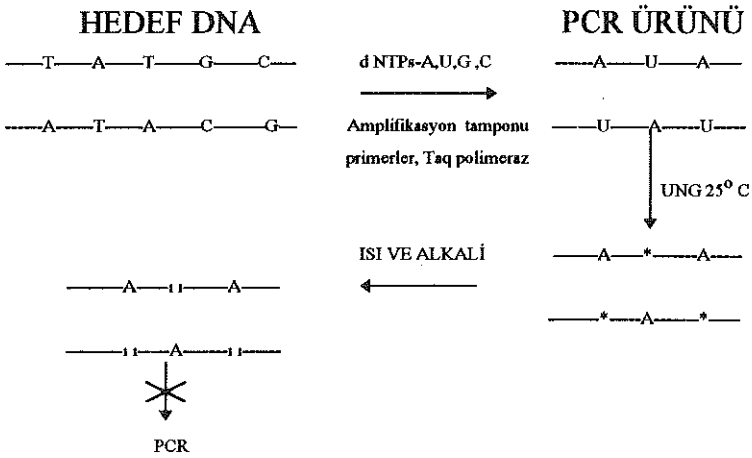
Örnekte tek bir hedef DNA molekülü bulunsa bile, "outer" ve "inner" primer çiftleri ile yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır. Böylece amplifikasyon sonucu oluşan fazla miktardaki hedef molekül - herhangi bir yalancı



Şekil 2
Nested amplifikasyonun şematik açıklaması.

negatiflik olmadan-kolayca gözlenebilmektedir. Nested amplifikasyon ile pozitif sonuç alma olasılığı arttığı için testin duyarlılığı da artmaktadır. Duyarlılığın çok yüksek olmasına bağlı olarak gözlenebilen önemli bir dezavantaj; birinci amplifikasyondan sonra tüpteki DNA ikinci amplifikasyon tüpüne aktarılırken, ürün çok az miktarlarda dahi çevreye saçılacak olur ise ilerki denemelerde hava yolu ile kontaminasyona yol açabilmektedir (2).

PCR teknolojisi, gerekli önlemler alınmadan uygulandığında önemli hatalara yol açabilmektedir. Uygulamadaki en önemli problem kontaminasyondur. Kontaminasyon; ya örneklerin birbirlerine karışması veya bir önceki amplifikasyon ürününün yeni amplifikasyon tüpüne karışması yoluyla olmaktadır. Amplifikasyon ürünü ile oluşacak kontaminasyonu (carry over contamination) elimine etmek için uracil N-glycosylase (UNG) enziminin kullanılması, kısa dalgalı UV ışınları ile muamele ve amplifiye edilen DNA'nın fotokimyasal modifikasyonu gibi işlemler uygulanmaktadır (6). UNG, DNA'daki deoksi urasilleri bularak onları molekülden uzaklaştıran bir enzimdir. Bu özelliğinden faydalanılarak "carry over" kontaminasyonu elimine etmede kullanılmaktadır. Özetle; amplifikasyon tüpüne, deoksi timidin trifosfat (dTTP) yerine deoksi urasil trifosfat (dUTP) konularak amplifikasyon gerçekleştirilmekte, böylece sentezlenen DNA'nın yapısına deoksi urasiller girmektedir. Bu DNA'lar, UNG ile muamele edildiğinde, enzim tarafından deoksi urasiller uzaklaştırılmaktadır. Deoksi urasilleri giderilen DNA molekülleri alkali ve ısının etkisiyle parçalanmakta ve sonuç olarak, amplifikasyon tüpüne karışmış olsalar bile amplifiye olamamaktadırlar (Şekil 3).



Şekil 3
Uracil N-glycosylase (UNG)'ın etki mekanizmasının şematik gösterilişi (6).

"Carry over" kontaminasyonun fotokimyasal inaktivasyonunda fotokimyasal bileşiklerden (psoralen ve isopsoralen) yararlanılmaktadır. Bu bileşikler DNA molekülündeki komplementer zincirler üzerinde bulunan karşılıklı ve birbirine yakın olan primidinler arasında köprü oluşturma özelliğindedirler. Bu oluşum DNA molekülünün yapısını bozarak PCR ile amplifikasyonunu olanaksız kılmaktadır. Amplifikasyon tüpüne gerekli maddeler konduktan sonra fotokimyasal inaktivasyonda kullanılacak madde de eklenerek amplifikasyon yapılmaktadır. Amplifikasyon tamamlandıktan sonra, tüpün ağzı açılmadan, kısa bir süre (15 dakika) 300-400 nm dalga boyundaki ışına maruz bırakılır. Böylece fotokimyasal maddenin primidinler arasına yerleşmesi sağlanmış olur (6).

"Carry over" kontaminasyonu önlemek için kısa dalga boyundaki UV ışınlarından da yararlanılmaktadır. UV ışınları ile muamele edilince kontamine DNA molekülündeki komşu timinler arasında dimerler oluşmakta ve DNA'nın yapısı bozulmaktadır. Böylece DNA'nın amplifikasyonu mümkün olmamaktadır (6).

AMPLİFİKASYON ÜRÜNÜNÜN GÖSTERİLMESİ

PCR teknolojisi kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürününün çeşitli yöntemlerle gösterilmesi ve/veya dizi analizinin yapılması ile tanı ve identifikasyona gidilmektedir. Amplifikasyon ürününün gösterilmesinde yaygın olarak şu yöntemler kullanılmaktadır.

1. *Etidyum bromid ile boyanan amplifikasyon ürünü çift sarmal DNA'nın UV ışını altında incelenmesi:* PCR uygulamasından sonra; bir miktar amplifikasyon ürünü, içinde etidyum bromid bulunan agarozda elektroforeze tabi tutulmaktadır. Etidyum bromid

DNA'ya bağlanarak UV ile floresans vermektedir. Aynı jel içinde örneğe yakın bir yerde "DNA size marker"da elektroforeze sokulmaktadır. *(DNA size marker'ları, faj DNA'larının restriction enzimleriyle farklı uzunluklarda kesilmesi ile elde edilmişlerdir. Her parçanın baz sayısı bilinmektedir ve bunlar elektroforezde farklı mesafelere yürümektedirler. Baz sayısına göre agarozda farklı yerlerde bantlar oluşturmaktadırlar).* Belli bir süre sonra jel UV altında incelenmektedir. Örnekten elde edilen DNA bandı, kendi hizasındaki marker DNA bandı ile karşılaştırılmaktadır. Eğer bu bant amplifikasyonu hedeflenen DNA segmenti ile aynı büyüklükte ise, özgül amplifikasyon sağlanmış demektir.

2. *Reverse dot blot hybridization:* Özgül bir "capture probe" sabit bir yüzeye (naylon membran veya plate) adsorbe edilmektedir. Adsorpsiyon işlemi probun 3' ucundaki poli timinlerin ultraviyole ışınlarının etkisiyle yüzeye kovalan olarak bağlanmasıyla olmaktadır. Amplifikasyon esnasında biotinle işaretli primerler kullanılarak biotinli DNA elde edilmektedir. Çift sarmallı olan biotinli DNA hidroliz edildikten sonra "capture probe"un bulunduğu sabit yüzeye eklenmektedir. Böylece probe ile biyotinli DNA arasında hibridizasyon gerçekleştirilmektedir. Yıkama işlemi ile proba bağlanmamış biotinli DNA'lar uzaklaştırıldıktan sonra, horseradish peroxidase enzimi ile işaretli streptavidin ortama konulmakta; streptavidin ile biotinin bağlanabilmesi için bir süre beklenmekte; sonra yıkama yapılarak bağlanmamış avidin-horseradish peroxidase uzaklaştırılmakta ve son aşama olarak ortama enzimin substratı eklenmektedir. Substratın kullanılması ile oluşan renk değişimi ölçülerek sonuç değerlendirilmektedir (7).

3. *Floresan boya ile işaretli primerler kullanılarak amplifikasyon ürününün gösterilmesi:* Amplifikasyonda floresan veren madde ile işaretli primerler kullanılmaktadır. PCR uygulaması tamamlandıktan sonra, selektif filtrasyonla DNA sentezine katılmamış primerler uzaklaştırılmakta, bunu takiben amplifikasyon ürünü jel elektroforezine tabi tutularak UV ışınları ile incelenmektedir.

4. *İşaretli problar ile hibridizasyon yapılarak amplifikasyon ürününün gösterilmesi:* Radyoaktif element, biotin, digoxigenin veya acridinium esterle işaretli özgül problar ile amplifikasyon ürünü DNA arasında hibridizasyon gerçekleştirilmekte ve oluşan hibridizasyon gösterilmek suretiyle tanıya gidilmektedir. Bu uygulamanın bir örneği şöyle olmaktadır. Amplifiye edilen DNA tek sarmal hale getirildikten sonra, acridinium ester ile işaretli probla hibridizasyona sokulmaktadır. Eğer hibridizasyon gerçekleşirse, alkali varlığında acridinium hidroliz olmamakta, son aşama olarak ortama hidrojen peroksit konulduğunda okside olarak ışık vermektedir (7).

PCR'IN KULLANIM ALANLARI

Genelde mikrobiyoloji ağırlıklı olmak üzere genetik hastalıklar ve kanser tanısında, organ transplantasyonunda ve adli tıpta PCR teknolojisi başarıyla uygulanmaktadır.

I - MİKROBİYOLOJİ ALANINDAKİ UYGULAMALAR

Rekombinant DNA teknolojisinin enfeksiyon hastalıkları alanında ilk kullanımı 1980'de, dışkı örneklerinde DNA-DNA hibridizasyon yöntemiyle enterotoksijenik *Escherichia coli* araştırması ile başlamıştır. Direkt örnekte yeteri kadar mikroorganizma bulunmadığında, bu tip hibridizasyon ile çoğu defa hatalı negatif sonuçlar alınmıştır (8). Bu sorun, örnekteki hedef DNA'nın PCR'la amplifikasyonu yapılarak giderilmiştir. PCR ile çoğaltılan DNA uygun problarla hibridizasyona sokularak tanıya gidilmektedir (7).

PCR teknolojisinin mikrobiyolojide yaygın olarak kullanıldığı alanlar şöyle sıralanabilir: (1) Kültürü yapılamayan veya üretilebilmesi için kompleks besiyeri ve uzun inkübasyon süresi gerektiren *Mycobacterium leprae, M.tuberculosis, M.bovis, Treponema pallidum, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae, Borellia burgdorferi* gibi mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonların tanısında. (2) Menenjit gibi kısa sürede tanı konulması hayati önem arz eden enfeksiyonların tanısında. (3) Biyokimyasal yöntemlerle kolayca tanımlanamayan mikroorganizmaların identifikasyonunda. (4) Human immundeficiency virus (HIV), Hepatitis B, Hepatitis C, human papilloma virus gibi birçok viral enfeksiyonun tanısında. (5) Antiviral tedavinin etkinliğini takipte. (6) Bazı mikroorganizmalarda antimikrobiyal direncin kısa sürede belirlenmesinde PCR teknolojisinden yararlanılmaktadır.

A - BAKTERİYOLOJİDE PCR UYGULAMALARI

Mycobacterium'ların tanısı ve genotipik identifikasyonu: Mycobacterium'ların jenerasyon sürelerinin uzun olması nedeniyle besiyerlerinde üretilmeleri için 3-8 haftalık süreye gerek vardır. İzole edilen etkenin biyokimyasal yollarla tanısı için ilave birkaç hafta gerekmektedir. Hastalığın kısa sürede tanımlanması yayılmayı önlemede ve etkin tedavide büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle moleküler biyoloji teknikleri tüberküloz laboratuvarlarına çok hızlı bir şekilde girmiştir. Patojen mikobakteri türlerine, Mycobacterium tuberculosis complex'e *(M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum* ve *M.microti)* özgü ve klinik örneklerden izole edilebilecek tüm mikobakterileri araştırmaya yönelik primerler geliştirilmiştir. *M.tuberculosis*'in tanısına yönelik olarak 65 kDa "heat shock protein", MBP 70 antijeni, MBP 64 proteini, IS6110 ve 38 kDa proteinini kodlayan gen bölgeleri "target" (hedef) DNA olarak kullanılmaktadır. Bunlardan özellikle IS6110, M.tuberculosis complex'in tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikobakterilerde 16SrRNA hedef nükleik asit olarak kullanıldığında, klinik örneklerde bulunabilecek tüm mikobakterilerin tanısı ve genetik olarak identifikasyonu yapılabilmektedir (9).

Chlamydia trachomatis'in tanısında PCR: Chlamydia trachomatis enfeksiyonlarının kesin laboratuvar tanısı hücre kültürlerinde inklüzyon cisimlerinin gösterilmesi ile konulmaktadır. Yaygın olarak kullanılan diğer testler direkt immünofloresans yöntemiyle elementer cisimciğin gösterilmesi ve enzim immunoassay'dır. Her iki yöntemde kullanılan

antikorlar major dış membran proteini (MOMP) veya lipopolisakkarit antijenlerine özgüldür. Kültür ve antijen araştırma yöntemleri ile tek bir endoservikal örnek incelendiğinde duyarlılık % 70 oranında iken, folikül ve inflamatuar trahom olgularında bu oran % 40 veya daha azdır. Tanıdaki bu zorlukları aşmak amacı ile PCR uygulamalarına başlanmış ve hedef olarak MOMP'yı kodlayan gen bölgesi veya 16S rRNA kullanılmıştır (10).

Treponema pallidum'un tanısında PCR: Treponema cinsi içinde insanlarda hastalık oluşturan iki tür *T.pallidum* ve *T.carateum*'dur. *T.pallidum subspp pallidum* veneriyal sifiliz; *T.pallidum subspp pertenue* yaws; *T.pallidum subspp endemicum* endemik sifiliz; *T.carateum* pinta hastalığını oluşturmaktadır. Bu dört patojenin antijenik yapı, genetik karakter ve morfolojik olarak ayrılmaları oldukça zordur. *T.pallidum subspp pallidum*'un oluşturduğu veneriyal sifilizin tanısında kullanılan serolojik testler nörosifiliz ve konjenital sifiliz gibi hastalıkların bazı formları için yeteri kadar duyarlı ve özgül değildir. Yine tanı amacı ile kullanılan karanlık alan mikroskopisinin duyarlılığı da düşüktür. Bu olumsuzlukları gidermek için moleküler biyoloji teknikleri denenmektedir. PCR da hedef olarak T.pallidum'a özgül 47 kDa major membran immunojenini kodlayan gen bölgesi veya 16 S ribozomal altbirimi kodlayan gen bölgesine yönelik primerler kullanılmaktadır (11).

Bakteriyel menenjitlerin tanısında PCR: Menenjitlerin kısa sürede tanısı mortaliteyi önemli oranda azaltmaktadır. Tanıda en değerli metod kültürdür. Ancak zaman almaktadır. Lateks aglütinasyon yöntemi ile antijen araştırılması kısa sürede sonuç vermekle birlikte duyarlılığı azdır ve güvenilir sonuçlar alınabilmesi için örneğin mililitresinde 10^5 kadar bakteri bulunması gerekir. Menenjit olgularının yaklaşık % 45'inde BOS da bu kadar bakteri bulunamadığından lateks aglütinasyon yöntemi yeteri kadar duyarlı değildir. Ayrıca bu testlerin özgüllüğü de yeterli değildir. PCR ile BOS'da yüzden fazla bakteriyel patojenin tanısı ve identifikasyonu yapılabilmektedir. PCR teknolojisinde menenjit oluşturan majör bakteriyel patojenlerin herbirinin DNA'sını amplifiye edebilecek primerler (universal primerler) kullanılmaktadır. Amplifikasyon tüpüne konulan bir çift universal primer ile örnekte bulunan mikroorganizmanın DNA'sı çoğaltıldıktan sonra, amplifikasyon sonucunu gösterme aşamasındaki hibridizasyonda özgül problar kullanılarak etkenin tanımı yapılabilmektedir (12).

Vibrio cholerae 01 suşlarında toksin üretiminden sorumlu genlerin araştırılması: Geçmişteki pandemi ve epidemilerden yalnızca kolera toksini üreten *V.cholerae* 01 suşları sorumlu olmuştur. Bu nedenle toksin üreten suşların belirlenmesi epidemiyolojik açıdan oldukça önemlidir. Toksin üretimini araştırmak amacı ile hücre kültürü deneyleri, immünolojik yöntemler ve DNA hibridizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerdeki zorlukların aşılması amacıyla toksinin A alt ünitesini kodlayan gen bölgesinin amplifikasyonunda PCR kullanılmıştır (13).

Escherichia coli'de ısıya dayanıklı, ısıya dayanıksız ve shiga-like toksin genlerinin araştırılması: Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC) suşları ya ısıya dayanıklı (ST) veya ısıya dayanıksız (LT) veyahut da her iki toksini birlikte oluşturmaktadırlar. Shiga-like toksin (SLT) oluşturan *E.coli* suşları kansız diyareden hemorajik kolite kadar değişen hastalık

oluşturmaktadır. Diyareye yol açan toksijenik *E.coli* suşlarının normal florada bulunanlardan ayrımı oldukça zordur. *E.coli* 0 157:H7 hariç ETEC veya shiga-like toksin oluşturan suşların tanısı için selektif ve ayırıcı kültür yöntemleri bulunmamaktadır. O ve H antijenlerinin serolojik olarak araştırılması ile patojenik gruba ait suşların bazılarının identifikasyonu yapılmakla birlikte, toksin üreten genlerin gösterilmesinin daha güvenilir olduğu belirlenmiştir. PCR ile yalnızca LT, ST ve SLT genleri değil bu genlerin varyantları (LTla, LTlb, STla, STlb gibi) da tanımlanabilmektedir (14).

Enteroinvaziv E.coli (EIEC) ve Shigella türlerinin PCR ile tanımlanması: Her iki bakteri de kanlı ve mukuslu diyareye yol açmaktadır. Bunların patogenezinde kolon epitel hücrelerine invaze olup çoğalma özellikleri rol oynamaktadır. Bu bakterilerde virulansı çoklu gen lokusları belirlemektedir. En az 4 genetik lokus büyük bir plazmid üzerinde taşınmaktadır. Bu plazmitte bulunan *inv* gen lokusu PCR çalışmalarında hedef olarak kullanılmaktadır (15).

Toksijenik Clostridium difficile'in tanısında PCR: C.difficile enterotoksin (Toksin A) ve sitotoksin (Toksin B) olmak üzere iki tip toksin oluşturmaktadır. *C.difficile* kolitlerinin tanısında toksinlerin gösterilmesinden yararlanılmaktadır; fakat hücre kültürü denemelerinden yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Toksin A'nın gösterilmesinde kullanılan enzim immunoassay yöntemleri çabuk ve duyarlı olmakla birlikte bazen yalancı pozitif sonuçlar vermektedir. PCR'ın, sitotoksik toksin deneyleri ve anaerobik kültürlerden daha duyarlı olduğu görülmüştür (16).

Bunların dışında *Staphylococcus aureus*'da enterotoksin, exfoliatif toksin ve toksik şok sendromu toksin-1 in gösterilmesinde (17), *Chlamydia pneumoniae* (18), *Bacteroides fragilis* (19), *Borellia burgdorferi* (2, 20), *Leptospira* (2), *Helicobacter pylori* (2), *Mycoplasma pneumoniae* (2) gibi birçok bakteriyel enfeksiyon etkeninin tanısında PCR denemeleri bulunmaktadır.

B - VİROLOJİDE PCR UYGULAMALARI

HIV enfeksiyonlarının tanısında PCR: Özellikle şüpheli serolojik bulguların doğrulanmasında enfekte anneden doğan çocukta enfeksiyon varlığının aydınlatılmasında ve enfekte oldukları halde henüz serokonversiyon oluşmamış bireylerdeki enfeksiyonun tanısında, proviral DNA'nın PCR ile amplifikasyonu oldukça yararlı sonuçlar vermektedir. Ayrıca tedavi altındaki hastaların serumunda viral RNA'nın kantitatif olarak araştırılması ile tedavinin etkinliğini takip etmek mümkün olabilmektedir (3, 21). Reverse transcriptase enzimini kodlayan gen bölgesinin amplifikasyonu ve dizi analizi yapılarak zidovudin (AZT) rezistansından sorumlu mutasyonları belirlemek mümkün olabilmektedir (22). Diagnostik amaçla yapılan çalışmalarda hedef olarak HIV'in "gag" bölgesi seçilmektedir.

Hepatit B virus enfeksiyonlarında PCR: Hepatit B virus enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak serolojik testler kullanılmaktadır. Ancak serolojik "marker"lar örneğin infektivitesini belirleme ve hastalığın prognozunu takip etmede bazan yetersiz kalmaktadır.

Hepatit B e antijeni (HBeAg) infektivite "marker"ı olarak kullanılan bir serolojik gösterge olmakla birlikte, yapılan çalışmaların bir kısmında HBeAg (+) olduğu halde HBV DNA'sı gösterilemeyen veya anti-HBe antikoru pozitif, HBV DNA (+) olan örnekler bulunmuştur. Bu bulgular infektiviteyi belirlemek ve prognozu takip etmek için HBV DNA'sının araştırılmasının önemini ortaya koymuştur. PCR ile hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) nin alttiplerini (d/y ve w/r) belirlemek de mümkün olabilmektedir. Alttiplendirmede, amplifikasyonu yapılan HBsAg gen bölgesinin dizi analizi yapılmaktadır. Alttip determinantlarından d/y'nin HBsAg gen bölgesinin 122'nci, w/r'nin 160'ncı kodonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (23).

Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonlarının tanısında PCR: HCV enfeksiyonlarının tanısında kullanılan antikor tarama testleri enfeksiyonun başlangıcından itibaren yaklaşık 22 haftalık bir dönem boyunca negatif sonuç vermektedir. Ayrıca serolojik testlerle akut enfeksiyon ile kronik enfeksiyonun ayrımı mümkün olmamaktadır. PCR çalışmalarında genomun en fazla stabil olan *5' untranslating region (5' UTR)* hedef olarak kullanılmaktadır. 5' UTR'nin amplifikasyonu ve dizi analizi ile HCV enfeksiyonlarının kısa sürede tanısı konulabildiği gibi, farklı ülkelerden elde edilen HCV'lerin tiplendirilmesi de yapılabilmektedir (24, 25).

Herpes simplex virus (HSV) enfeksiyonlarının tanısında PCR: Özellikle HSV'unun santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tanısında PCR oldukça önemlidir. Konvülsiyonlu yenidoğanda BOS'da HSV DNA'sının gösterilmesinin tanısal değeri büyüktür. PCR uygulamalarında HSV DNA polymerase geni, tymidin kinase'ı kodlayan gen bölgesi ve glikoprotein gen bölgesine özgü primerler kullanılmaktadır (26).

Papilloma virusların tiplendirilmesi ve enfeksiyonlarının tanısında PCR: İnsan papilloma viruslarının bazı tipleri (tip 6 ve 11) iyi huylu, bazıları (tip 16,18,31,35) ise kötü huylu tümörlerden sorumludur. Bu nedenle klinik örneklerde bulunan papilloma virusların tiplendirilmesi büyük önem arz etmektedir. PCR ile viral nükleik asitin amplifikasyonu yapılmakta ve tipe özgü problar kullanılarak tiplendirme gerçekleştirilmektedir. Yapılan bir çalışmada; iyi huylu prostat hiperplazisi bulunan 15 kişinin 14'ünde, karsinomalı 4 kişinin 4'ünde human papilloma virus (HPV) tip 16 saptanmıştır (27). Başka bir çalışmada meatus urethrae'da condyloma acuminata bulunan 17 erkek hastadan alınan idrar örneklerinin PCR ile incelenmesinde, 8 hastada HPV tip 6, 6 hastada HPV tip 11 ve bir hastada HPV tip 6 ve 11 bulunmuştur (28).

Parvovirus B19 enfeksiyonunun tanısında PCR: Parvovirus 5.6 kb'lık tek sarmal DNA içeren bir virustur. Genellikle solunum yoluyla bulaşmakta, sıklıkla çocuklarda 5. hastalık veya erythema infectiosum denen hastalığa yol açmaktadır. Tanıda serolojik yöntemler, elektron mikroskopi ve DNA hibridizasyon yöntemleri kullanılmakla birlikte, persistan enfeksiyonda ve maternal enfeksiyonun araştırılmasında PCR önemli rol oynamaktadır (29).

Influenza virus A, B ve C'nin tiplendirilmesi ve enfeksiyonların tanısında PCR: Influenza virus A'nın nöraminidaz (N 1,2), hemaglutinin (H 1,2,3) ve matriks protein genlerine; influenza virus B'nin hemaglutinin ve matriks protein ve influenza virus C'nin hemaglutinin genlerine özgü primerler kullanılmaktadır (30, 31).

Bunların dışında Rotavirus, Adenovirus, Enterovirus, Cytomegalovirus, Rubella, Parainfluenza, Norwalk virus gibi birçok virusun oluşturduğu enfeksiyonun tanısında da PCR teknolojisinden yararlanılmaktadır (2).

C - MİKOLOJİDE PCR UYGULAMALARI

Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatidis ve Coccidioides immitis, Pneumocystis carinii, Candida albicans gibi mantar enfeksiyonlarının tanısında ve etkenlerin identifikasyonunda PCR denemeleri bulunmaktadır (2).

D - PARAZİTOLOJİDE PCR UYGULAMALARI

Trypanosoma türleri (hedef olarak; nükleus veya bazı türlerde kinetoplast DNA'sı), Leishmaniae türleri (hedef olarak; kinetoplast veya rRNA), Plasmodium falciparum, Entamoeba hystolitica (hedef; rRNA), Babesia microti (hedef; rRNA) ve Giardia lamblia (hedef; 16 S rRNA) hastalıklarının ve toksoplazmozis'in tanısında PCR denenmiştir (2).

E - ANTİMİKROBİAL DİRENCİN SAPTANMASINDA PCR TEKNOLOJİSİNİN KULLANIMI

Mycobacterium tuberculosis ve M.leprae'nın rifampisine dirençli mutantlarının belirlenmesi: Rifampisin RNA polimeraz enziminin β alt ünitesine bağlanarak transkripsiyon ve RNA'nın uzamasını engellemektedir. Mycobacterium'lardaki rifampisin direncinin *rpo* β geni tarafından kodlanan sınırlı sayıdaki aminoasitte meydana gelen değişime bağlı olduğu anlaşılmıştır. PCR çalışmalarında *rpo* β geninin *Rif*'yi kodlayan bölgesinin amplifikasyonu ve sonra dizi analizi ile aminoasit değişikliği gösterilebilmekte ve böylece 2-3 gün içinde rifampisine direnç belirlenmektedir. Mutasyonların çoğunlukla 23 amino asitlik bölgedeki 8 kodondan birinde tek bir nükleotid değişikliğini takip ettiği ve en fazla değişimin (% 52) 21'nci amino asitte olduğu bulunmuştur (58). Klinik örneklerdeki rifampisine dirençli suşları belirlemek üzere PCR-SSCP (PCR single-strand conformation polymorphism) de kullanılabilmektedir. Bu yöntemde radyoaktif elementle işaretli nükleotid ([α-^{32}P] dCTP) kullanılarak amplifikasyon yapılmakta, sonra denatüre edilen amplifikasyon ürünü "nondenaturing sequencing-format gel" de elektroforeze sokulmaktadır. Elektroforezi takiben jel bir filtre kağıdına aktarılarak kurutulmakta ve üzerine film kapatılarak bir gece bekletildikten sonra, banyo yapılarak film üzerindeki bantlar incelenmektedir. Bu yöntemde dizi analizi yapılmasına gerek kalmadan mutasyonlar saptanabilmektedir (32).

HIV'deki ilaç direncinin belirlenmesi: Zidovudin (AZT)nin HIV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılması ile birlikte direnç sorunu da gündeme gelmiştir. AZT rezistansının

reverse transcriptase gen bölgesindeki 5 kodonda (kodon 41,67,70,215 ve 219) oluşan nokta mutasyonla ilgili olduğu bulunmuştur. PCR'da özgül primerler kullanılarak, virusun reverse transcriptase gen bölgesindeki mutasyon noktalarının da bulunduğu belirli gen segmentinin amplifikasyonu yapılmakta ve bunu takiben baz dizi analizi yapılarak varsa mutasyonlar belirlenmektedir (22).

"Erm" Eritromisin direnç geninin araştırılması: Eritromisine karşı bakteriyel direncin en yaygın şekli "Erm methyltransferase" enziminin üretilmesidir. Bu enzim 16 S rRNA'daki özgül adenin'in N-6 pozisyonunda metilasyona yol açmakta ve bunun sonucu olarak makrolitler, linkozamid ve streptogramin B-tip antibiyotiklere karşı korezistans oluşumuna yol açmaktadır. PCR ile *erm* geni amplifiye edilmiş ve dizi analizi yapılabilmiştir (33).

Metisiline dirençli Staphylococcus aureus'ların tanısında PCR: Metisiline dirençli *S.aureus*'lar beta laktam antibiyotikleri için düşük afinitesi olan penicillin binding protein 2' (PBP 2') veya PBP2a olarak adlandırılan yeni bir penisilin bağlayan protein oluşturmaktadırlar. Bu proteinlerin oluşumu *mec A* geninin kontrolündedir. Metisilin direnci çoğunlukla heterojenlik göstermektedir. Çok düşük seviyede dirence sahip olan suşların; disk difüzyon, agar ve broth dilüsyonu gibi rutin yöntemlerle gösterilmesi sorun olabilmektedir. Rutin yöntemlere alternatif olarak PCR teknolojisi ile *mec A* genine özgü primerler kullanılarak amplifikasyon yapılmakta ve böylece genin varlığı tesbit edilebilmektedir (34).

Bunların dışında *Neisseria gonorrhoeae*'da penisilinaz üretiminden sorumlu ve plazmid üzerinde bulunan TEM-1 beta laktamaz geninin araştırılmasında (35), aminoglikozitleri modifiye eden enzimleri kodlayan genlerin araştırılmasında (36) ve geniş spektrumlu beta laktamazların oluşumundan sorumlu genlerin tanısı ve identifikasyonunda (37) PCR teknolojisinden yararlanılmaktadır.

II - PCR'IN DİĞER KULLANIM ALANLARI

A - Genetik hastalıkların tanısında PCR kullanımı:

PCR, genetik hastalıklar alanında ilk olarak bir kan hastalığı olan "sickle cell anemia"nın tanısında kullanılmıştır. Bu teknik ile birkaç saat içinde "sickle cell anemia" tanısı konulabilmektedir. Bunun dışında "hemofilia", "cystic fibrosis" ve "muscular dystrophy"nin tanısında da PCR teknolojisinden yararlanılmaktadır. Genetik hastalıkların tanısında, ilk aşama olarak PCR ile hastalıktan sorumlu gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmakta, sonra bu gen bölgesinin baz dizisi sağlıklı geninki ile karşılaştırılmaktadır. Genetik hastalıkların prenatal tanısı için de PCR kullanılabilmektedir. Amniyotik sıvıdan alınan çok az sayıdaki fetal hücrelerle yapılan amplifikasyon ve baz dizi analizleriyle genetik bozuklukları saptamak mümkün olabilmektedir (1, 38).

B - Kanser tanısında PCR uygulamaları:

Kanserin erken tanısı tedavide başarılı sonuç alınmasında oldukça önemlidir. Fakat pratikte bu o kadar kolay olmamaktadır. Çoğu kanserler, tanımlanabilir tümör oluşumunu sağlayacak sayıda hücre oluştuktan sonra patolojik olarak tanımlanabilmektedir. Oysa, PCR teknolojisi ile kanser oluşumunun daha başlangıcında yalnızca birkaç hücredeki değişimleri saptayarak, erken tanı koymak mümkün olabilmektedir. Lösemi, pankreas, akciğer, meme ve kolon kanserlerinin tanısında bu teknolojiden yararlanılabileceği belirtilmektedir (1, 39, 40).

C - Organ transplantasyonunda PCR uygulamaları:

Transplante edilen doku alıcının genetik yapısına yabancı olduğunda, ona karşı oluşan immünolojik yanıt ile reddedilmektedir. Yabancı hücrelerin tanınmasından *human leukocyte antigens* (HLA complex) sorumludur. Bu antijenler kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Transplantasyonun başarısı alıcı ve vericinin HLA genlerinin birbirine yakınlığı ile doğrudan ilgilidir. PCR ile alıcı ve vericiye ait özgül HLA gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmakta, sonra DNA baz dizilimleri karşılaştırılarak aradaki homoloji çok duyarlı bir şekilde gösterilmektedir (1, 40).

D - Adli tıpta PCR uygulamaları:

Adli tıpta, zan altında bulunan kişinin doğrulanmasında; suç yerindeki bir kıl, birkaç semen hücresi veya bir damla kandan PCR ile amplifiye edilen özgül DNA segmentindeki baz sıralaması, zan altındaki kişinin DNA'sındaki baz dizilimi ile karşılaştırılmaktadır. Babalık tayininde; çocuktaki babadan gelen HLA gen dizilimi ile babanınki karşılaştırılarak çocuğun babaya ait olup olmadığı söylenebilmektedir (1, 40).

Teşekkür

Makaleyi büyük bir titizlikle okuyarak olumlu katkılarda bulunan, Moleküler Biyoloji Profesörü Dr. Bülbin Sunar Akbaşak'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ: Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 1991, 252: 1643-1651.
2. Persing DH: In vitro nucleic acid amplification techniques, p.51-87. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.
3. Winters MA, Tan LB, Katzenstein DA, Merigan TC: Biological variation and quality control of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA quantitation by reverse transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993, 131: 2960-2966.
4. Katcher HI, Schwartz I: A distinctive property of Tth polymerase: enzymatic application in the presence of phenol. Bio Techniques, 1994, 16: 84-92.

5. Bagasra O, Seshamman T, Pamerantz RJ: Polymerase chain reaction in situ: Intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. J Immunological Methods 1993, 158: 131-145.

6. Persing DH, Cimino GD: Amplification product inactivation methods, p.105-121. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993; American Society For Microbiology, Washington DC.

7. White TJ: Amplification product detection methods, p.138-14. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

8. Moseley SL, Huq I, Alim ARMA, So M, Samadpour-Motalebi M, Falkow S: Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridization. J Infect Dis 1980, 142: 892-898.

9. Kirschner P, Meier A, Böttger EC: Genotypic identification and detection of Mycobacteria-Facing novel and uncultured pathogens. p.173-190. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

10. Bauwens JE, Clark AM, Stamm WE: Diagnosis of Chlamydia trachomatis endoservical infections by a commercial polymerase chain reaction assay. J Clin Microbiol 1993, 31: 3023-3027.

11. Radolf JD: PCR detection of Treponema pallidum. p.224-229. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

12. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D: PCR primers and probes for 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1994, 32: 335-351.

13. Ramamurthy T, Pal A, Bag PK, et al: Detection of Cholera toxin gene in stool specimens by polymerase chain reaction: Comparison with bead enzyme-linked immunosorbent assay and culture method for laboratory diagnosis of cholerae. J Clin Microbiol 1993, 31: 3068-3070.

14. Olsvik O, Strockbine NA: PCR detection of Heat-stable, heat-labile, and shiga-like toxin genes in Escherichia coli. p.271-276. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

15. Schoolnik GK: PCR detection of Shigella species and enteroinvasive Escherichia coli. p.277-281. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

16. Gumerlock PH, Tang YJ, JrSilva J: PCR detection of toxigenic Clostridium difficile, p.288-293. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

17. Johnson WM, Tyler SD: PCR detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin-1 in Staphylococcus aureus. p.294-299. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

18. Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR, et al: Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of Chlamydia pneumoniae in symptomatic and asymptomatic patients. J Clin Microbiol 1994, 32: 903-905.

19. Yamashita Y, Kohno S, Koga H, Tomono K, Kaku M: Detection of Bacteroides fragilis in clinical specimens by PCR. J Clin Microbiol 1994, 32: 679-683.

20. Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH: Detection of Borrelia burgderferi DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with lyme arthritis. New Engl J Med 1994, 330: 229-224.

21. Montoya JG, Wood R, Katzenstein D, Holodny M, Merigan TC: Peripheral blood mononuclear cell human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA quantification by polymerase chain reaction. Relationship to immunodeficiency and drug effect. J Clin Microbiol 1993, 31: 2692-2696.

22. Durmaz R: Molecular basis of HIV resistance to zidovudine and its detection by polymerase chain reaction (PCR). Turgut Özal Tıp Merkezi Derg, 1994, 1(4): 321-323.

23. Yokosuka O, Tagawa M, Omata M: PCR detection hepatitis B virus. p.322-326. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

24. Kleter GEM, vanDoorn LJ, Brouwer JT, Schalm SW, Heijtink RA, Quint WGV: Sequence analysis of the 5' untranslated region in isolates of at least four genotypes of hepatitis C virus in the Netherlands. J Clin Microbiol 1994, 32: 306-310.

25. McOmish F, Yap PL, Dow BC, et al: Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. J Clin Microbiol 1994, 32: 884-892.

26. Rozenberg F, Lebon P: Amplification and characterization of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid from patient with acute encephalitis. J Clin Microbiol 1991, 29: 2412-2417.

27. McNicol PJ, Dodd JG: Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. J Clin Microbiol 1990, 28: 409-412.

28. Bauer HM, Manos MM: PCR detection genital human papillomavirus. p. 407-413. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

29. Rogers BB, Mak SK, Dailey JV, Saller JR, Buffone GJ: Detection of parvovirus B19 DNA in amniotic fluid by PCR DNA amplification. Bio Techniques 1993, 15: 406-410.

30. Zhang W, Evans DH: PCR detection and differentiation of Influenzae virus A, B and C strains. p. 374-383. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology. Washington DC.

31. Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken TH: Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenzae A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. J Clin Microbiol 1994, 32: 623-628.

32. Imboden P, Cole S, Bodmer T, Telenti A: Detection of rifampin resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis and M. leprae. p. 519-526. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

33. Arthur M, Molinas C, Mabilat C: PCR detection of erm erythromycin resistance genes by using degenerate oligonucleotide primers. p. 534-538. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

34. Richard P, Meyran M, Carpentier E, Thabaut A, Drugeon HB: Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 1994, 32: 613-617.

35. Simard JL, Roy PH: PCR detection of penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. p. 543-546. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

36. van de Klundert JAM, Vliegenthart JS: PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. p. 547-552. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

37. Mabilant C, Goussard S: PCR detection and identification of genes for extended-spectrum B-lactamases. p. 553-559. In Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications. 1993, American Society For Microbiology, Washington DC.

38. Sambrook J, Fritsch EF: Maniatis, Molecular cloning. A laboratory manual, p. 145, 1989, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.

39. Reed TJ, Reid A, Wallberg K, O'Leary TJ, Frizzera G: Determination of B-cell clonality in paraffin embedded lymph nodes using the polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol 1993, 2 (1): 42-49.

40. Tagliavacca L, Sacchi E, Mannucci PM: Carrier detection and feasibility of prenatal diagnosis of hemophilia B by multiplex polymerase chain reaction. Int J Clin Lab Res 1993, 23: 169-171.