ANKEM Derg 12 (No.3):232-237(1998)

İNFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISINDA MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİNİN YERİ

Salih TÜRKOĞLU

İnfeksiyon hastalıklarının tanısında moleküler biyolojik yöntemler denince, tanıda hedef alınan molekülün DNA ya da RNA olduğu yöntemler anlaşılmaktadır. Bu yöntemlerden ilk kullanılanı hibridizasyon yöntemi olmuştur. Bu yöntemle mikroorganizma tanısı ve özellikle idantifikasyonu oldukça yaygın bir biçimde kullanıma girmiş ve halen de bazı alanlarda başarı ile kullanımı sürmektedir. Yöntemin yaygın kullanımına olanak sağlayan en önemli unsurlardan biri ticari kitlerin geliştirilmesi olmuştur. Bilindiği gibi hibridizasyon (nükleik asit hibridizasyonu), RNA ya da DNA birbirine komplemanter bazlardan oluşan iki nükleik asit zincirinin, in-vitro koşulların istenildiği gibi değiştirilmesi ile birbirlerinden ayrılması (denatürasyon) ya da tekrar birleştirilmesi (renatürasyon=hibridizasyon)'nun kullanıldığı bir yöntemdir. Burada her mikroorganizma için son derece özgül olan nükleik asit dizileri hedef alınır. Bunun için, araştırılan mikroorganizmanın hedeflenen dizilerinin sırasının daha önceden bilinmesi esastır. Yöntem immünolojik yöntemlere göre daha özgün olduğu gibi, nükleik asitlerin (özellikle DNA'nın) stabilitesi ve her mikroorganizma için ayrı prosedür gerektirmemesi ile diğer yöntemlere üstünlük göstermektedir. Son yıllarda nükleik asitlerin (NA) çoğaltılmasını mümkün kılan yöntemler, tek başına nükleik asit hibridizasyonunun "pabucunu dama atmıştır". Ancak yöntem ne olursa olsun, hedef nükleik asit eldesi ve çoğalmasını takiben bir hibridizasyon aşaması nerede ise vazgeçilmezdir (Gerek çoğaltmalı, gerekse çoğaltmasız, nükleik asit hibridizasyonunun çeşitli formatları vardır, ancak burada tartışılmayacaktır). Nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin infeksiyon hastalıklarının tanısında ilk ve en yaygın kullanılanı polimeraz zincir reaksiyonudur (polymerase chain reaction, PCR). Bu yöntemlerin gündeme gelmesini sağlayan ve ilk olarak "icat" edilen yöntem PCR'dır. Mucidine (K.Mullis) Nobel ödülü kazandırmıştır. PCR'ın yalnızca infeksiyon hastalıkları değil birçok alanda bilim dünyasına kazandırdıkları inanılmaz boyutta olmuştur. Kullanıma girdiği birçok alanda hızlı ve verimli veri alınmasını sağlamış, bilime hız, böylece "yıllar" kazandırmıştır. Önemli bir kazanım da düşünme tarzında olmuş, varolan bilgilerin akıllıca bir araya getirilmesi ile nerede ise PCR kadar dahiyane başka nükleik asit çoğaltma yöntemleri de ortaya çıkmış, kullanıma girmiştir. Kuşkusuz bunda PCR'ın dünyada yalnızca bir tek firmanın patentinde kalması da etkili olmuştur. Diğer ticari kuruluşlar bunu aşmak için başka yöntemler arayışına girmişler ve bunda başarılı olmuşlardır. Kolayca anlaşılacağı gibi hem PCR hem de diğer bazı yöntemler şu anda ticari (ve standart) yöntemler olarak dünyada piyasaya çıkarılmışlardır. Aşağıda bu yöntemler kısaca tanımlandıktan sonra, başlıca İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı'nda bu yöntemlerin tanıda kullanıldığı mikroorganizmalardan ve bunların tanısında bu yöntemlerin yerinden söz edilecek ve son olarak da, halen moleküler yöntemlerin saptanmalarında (gerek klinik tanı, gerekse araştırma amaçlı) kullanıldığı mikroorganizmaların geniş bir listesi verilecektir. Mikroorganizmaların miktar tayininin yapılabildiği "kantitatif" yöntemler bu kitapta diğer bir yazının konusu olduğu için burada onlardan söz edilmeyecektir.

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul.

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR): Yukarıda da değinildiği gibi en çok kullanılan yöntemdir. Nükleik asit eldesini takiben hedeflenen DNA dizisinin her iki ucuna özgül olarak önceden sentezlettirilen, "primer" denen 20-40 bazlık kısa (oligonükleotid) DNA dizileri, termostabil bir DNA polimeraz ve DNA'nın yapıtaşları dNTP'ler (deoksinükleosid trifosfatlar) tek bir tüpte bir araya getirilir. DNA çoğaltılması "thermal cycler" denen özel bir alette ısının yükseltilip alçaltılması ile sağlanır. Çoğaltma 1-3 saat sürer. Ürünler en basit ve ucuz şekilde agaroz jel elektroforezi ile saptanabildiği gibi, tercihan bir (sıvı ya da katı fazda; radyoaktif ya da non-radyoaktif olarak) hibridizasyon ile saptanırlar. Bu aşamaya alternatif olarak PCR aşamasının farklı -internal- primerler kullanılarak tekrarlanması ile hem özgüllüğü hem de duyarlılığı artmış olan nested PCR da sık olarak başvurulan bir yöntemdir. PCR bir hedef çoğaltma yöntemidir. Piyasada bu yöntemle hazırlanmış çeşitli mikroorganizmaların saptanmasını sağlayan ve bazıları uluslararası kabul görmüş standart kitler bulunmaktadır.

TAS (Transcription-based amplification system), 3SR (Self sustained sequence replication) ve NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification): İn-vitro transkripsiyon ile çoğaltılmanın sağlandığı sistemlerdir. Oligonükleotid primerler burada da kullanılır. Revers transkriptaz ve RNA polimeraz (NASBA ve 3SR'da bunlara ek olarak RNAse H) enzimleri kullanılır. Nükleik asit eldesini takiben ilgili reaktifler tek bir tübe konur ve reaksiyon tek bir ısıda (izotermal) gerçekleştirilir. Çoğalmış nükleik asitler çeşitli hibridizasyon formatlarında saptanabilirler. Bu yöntemler de hedef çoğaltma yöntemleridirler. Piyasada bazı mikroorganizmalar için hazır olan ve yavaş yavaş kullanıma girmiş olan kitleri bulunmaktadır.

Ligaz zincir reaksiyonu (LCR): Bu yöntemde özgül oligonükleotidler, termofilik DNA ligaz ve dNTP'ler kullanılır. Hedef DNA eldesinden sonra reaktifler hedef DNA ile birlikte bir tüpe konurlar. Aynı PCR'da olduğu gibi "termal cycler" ile ısı değişimleri yapılır ve çoğaltma sağlanır. Ancak burada DNA polimerizasyonu yoktur. Oligonükleotid primerler hedef DNA ile hibridize olduktan sonra DNA ligaz ile bağlanırlar ve her döngüde çoğalarak reaksiyon sonunda hibridizasyon ile saptanırlar. Burada çoğalan (ya da çoğaltılan) probtur. Piyasada çeşitli mikroorganizmalar için kit olarak bulunmaktadır.

Dallanmış problar (Branched DNA, bDNA): Bu yöntemde enzim kullanılmaz yani DNA ya da RNA polimerizasyonu ya da ligasyon yoktur. Hedef DNA'ya çok sayıda prob bağlanır ve bu problar bir yandan katı faza, bir yandan da başka problara bağlanırlar. Reaksiyonun son aşamasında üzerlerine işaretli problar bağlı tıpkı bir ağaç dalı gibi olan problar hedef DNA'nın üzerindeki aracı problara bağlanırlar ve eklenen lüminesan substratı renklendirirler. Yani hedef nükleik asit çoğalmamasına rağmen üzerine her aşamada sayıları artan problar eklenir ve böylece "işaret" -signal- çoğalmış olur. Reaksiyon tek bir ısıda gerçekleşir. Şu anda tek bir firmanın ürünü olarak piyasada kitleri bulunmakta ve kullanılmaktadır.

Yukarıda sayılan yöntemlerden başka yöntemler de infeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılmak üzere tasarlanmış, hatta bir kısmı ticari olarak piyasaya da verilmiştir. Bu yöntemler temelde PCR ya da yepyeni çoğaltma prensipleri kullanırlar. Bunlar arasında Qß replikaz, SDA (Strand displacement amplification), Amplisensor ve

Taqman sayılabilir.

Hepatit B virusu (HBV) infeksiyonlarında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: Hepatit B virusu infeksiyonlarının tanısında virusun antijenleri ve bunlara karşı oluşan antikorların serumda gösterilmesi ile hastalığın evresi ve takibi için önemli veriler elde edilebilmektedir. Ancak viral DNA'nın kalitatif ya da kantitatif olarak serumda gösterilmesi birçok yönden diğer yöntemlere önemli katkılar sağlamaktadır. Bunlardan en önemlisi viral replikasyonun en iyi ve en duyarlı göstergesinin serumda HBV DNA'nın saptanması oluşudur. Bu yöntemlerden kantitatif olanları başka bir yazının konusudur. Kalitatif olarak HBV DNA'sının serumda saptanması diğer yöntemlerle sonuç alınamayan durumlarda, seronegatif HBV infeksiyonlularda ve virusun tiplerinin belirlenmesinde başvurulan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır(1). HBV DNA'sını serumda saptamaya yönelik ticari moleküler tanı kitleri gerek kantitatif PCR, gerek diğer çoğaltma yöntemlerini, gerekse direkt olarak hibridizasyonu kullanmaktadır.

Hepatit C virusu (HCV) infeksiyonlarında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: Bilindiği gibi hepatit C virusu (HCV) son bulunan hepatit etkeni viruslar arasında yol açtığı hastalığın ciddiyeti bakımından en önemli olanıdır. Bir başka önemi ya da özellikli yönü moleküler yöntemlerle tanınmış olmasıdır. Kültürü de yapılamadığı için bu yöntemler tanısında özel bir yer tutarlar. Tanıda en sık kullanılan yöntem olan antikor testi (anti-HCV) bazı yetersizlikler içerir. Bunları sıralarsak: anti-HCV sıklıkla viremi ile birlikte saptansa da HCV-RNA'nın varlığını göstermemektedir; antikorların özgüllüğünün doğrulanması gerekmektedir; akut infeksiyonlu hastalar tüm akut faz boyunca seronegatif kalmaktadırlar; kan ürünü alan kişilerde pasif olarak geçmiş antikorlar pozitif antikor testine ve yanlışlıkla HCV infeksiyonu tanısı konmasına neden olabilmektedirler. Bu yüzden aşağıda sıralanan durumlarda HCV-RNA testi uygulanır: 1- Serolojik tanının doğrulanması, 2- Kan donörlerinde HCV saptanması, 3- Akut HCV infeksiyonunun tanısı, 4- HCV taşıyıcılığının saptanması, 5- Bağışıklık sistemi baskılanmışlarda HCV infeksiyonu tanısı, 6- Viremi düzeyinin saptanması ve tedavinin izlenmesi, 7- HCV genomunun incelenmesi(6).

HIV infeksiyonlarının tanısında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: HIV infeksiyonlarında da NA çoğaltma yöntemleri standart kitlerin de kullanıma girmesi ile uygulanmaya başlanmıştır. Buradaki kullanım alanları şöyle sıralanabilir: 1- İnfekte kişilerin lökositlerinde HIV DNA'sının, plazmalarında RNA'sının gösterilmesi ve miktar tayininde, 2- İnfeksiyonun pencere döneminde antikor oluşana kadar geçen sürede HIV infeksiyonu tanısında, 3- Diğer yöntemlerle sonuç alınamayan durumlarda, 4- Yenidoğanlarda ve 15 aya kadar bebeklerde HIV infeksiyonu tanısında, 5- HIV-1 ve HIV-2'nin birlikte etken oldukları karışık infeksiyonların saptanmasında, 6- Aşılanmış ve buna bağlı olarak serolojik yöntemlerle pozitif olan ancak HIV proviral DNA'yı taşımayan kişilerde HIV infeksiyonu tanısında, 7- HIV ile infekte kişilerde prognozu saptamada, 8- Tedavide kullanılan antiviral ilaçlara karşı direnç gelişimini izlemede(7).

Cytomegalovirus (CMV) infeksiyonlarının tanısında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: *Herpesviridae* ailesinin bir üyesi olarak latent infeksiyonlara yol açan CMV birçok sağlıklı kişide bulunur ve infeksiyon genelde asemptomatiktir. Buna karşılık in-utero (primer infeksiyon) olarak ve organ nakli yapılmışlar ya da AIDS gibi bağışıklık sistemi baskılanmışlarda klinik belirtili, yaşamı tehdit eden infeksiyonlara (primer ya da reaktivasyon) yol açar. CMV infeksiyonlarının tanısında idrar ya da periferik kanın lökositleri kullanılarak hücre kültürü yapılmaktadır. En son kullanılan hücre kültürü yöntemleri 16 saat gibi bir sürede (geleneksel yöntemlere kıyasla) "hızlı" sonuç

verseler de, hem her laboratuvarın kullanamadığı tekniklerdir hem de hücre kültürü teknik olarak emek-yoğun bir tekniktir. Son yıllarda viral DNA ve RNA'nın saptandığı moleküler teknikler sistemik CMV hastalığının erken tanısında önem kazanmışlardır(3). Bu yöntemlerin duyarlılıkları yüksektir ve hızlı tanı sağlarlar. Piyasada ticari olarak satın alınabilen CMV tanı kitleri bulunmaktadır.

Enterovirus infeksiyonlarının tanısında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: *Picornaviridae* ailesinin bir üyesi olan, *Poliovirus*'lar, A ve B grubu *Coxsackievirus*'lar, *Echovirus*'lar ve diğer numaralandırılmış enterovirusları içeren bu grup insanda hastalık yapan mikroorganizmalar arasında önemli bir yere sahiptir ve birçok sistemi ilgilendirebilen hastalık tabloları oluşturur. Tanıda en sık kullanılan ve "gold standart" olan yöntem hücre kültürüdür ve kullanımı hücre kültürü yöntemi ile ilgili dezavantajları içerdiği gibi bazı enteroviruslar hücre kültüründe üremezken bazı serotipler son derece yavaş ürerler. Enterovirusların tanısında NA çoğaltma teknikleri ve özellikle de PCR önemli bir potansiyel içermektedir. En önemli avantajlarından bir tanesi tüm enteroviruslara ortak diziler içeren genom bölgelerinin bulunması ve çoğaltmada bunların hedeflenmesidir(5). Muayene maddesi olarak BOS, serum ve idrar kullanılabilecektir. Enterovirusların moleküler tanı yöntemleri (PCR) ile saptanmasını sağlayan ticari bir kit halen piyasada bulunmaktadır.

Herpes simplex virusu (HSV) infeksiyonlarının tanısında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: *Herpesviridae* ailesinin bir üyesi olarak latent infeksiyonlara yol açan bu virusların yol açtığı klinik tablolar arasında tanıda güçlüklere yol açan ve moleküler yöntemleri gündeme getiren HSV ile olan merkez sinir sistemi (MSS) infeksiyonlarıdır. Ensefalitlerin yaklaşık %10'undan sorumludurlar. Tedavi olmadığında mortalite %70 kadardır ve uygun tedavi bu oranı %20'ye düşürebilir. Tanıda kullanılmakta olan hücre kültürünün duyarlılığı düşüktür ve yavaş sonuç verir. BOS'ta antijen ve antikor aranmasının da duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür. PCR ile HSV genom dizilerinin BOS'ta saptanması birçok araştırmacı tarafından başarı ile uygulanmıştır(2). Halen bu amaçla hazırlanan ticari bir kit piyasada bulunmaktadır.

Rubella infeksiyonlarının tanısında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: Rubella infeksiyonu, yol açtığı akut, döküntülü kızamıkçık tablosu ve konjenital infeksiyonlardan başka, komplikasyonlarının romatolojik, otoimmün ve nörolojik tablolar olabildiği bir dizi hastalığa da yol açabilmektedir. Hamile kadınlardaki infeksiyon birçok ülkede aşılama ile kontrol edilebilir hale gelmişse de rubella infeksiyonunun bazı bölgelerde artış göstermekte olduğu bildirilmektedir. Bu yüzden hastalığın hızlı tanısı önem kazanmaktadır. Tanıda kullanılan hücre kültürü yöntemi, virusun kültürde üremesinin yavaş ve zor oluşu ve sitopatik etkisinin az oluşu nedeni ile başarılı olmaktan uzaktır. Rubella tanısı için PCR, hem klinik örneklerde virusun duyarlı olarak saptanması, hem de kültür konfirmasyonu için başarı ile kullanılmıştır. Rubella PCR'ı için laboratuvarlar kendi reaktif ve prosedürleri ile çalışmaktadırlar.

Chlamydia infeksiyonlarının tanısında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin yeri: *Chlamydia trachomatis* genitoüriner sistem, rektum, nazofarinks ve konjunktiva gibi çeşitli mukoza yüzeylerinde infeksiyona yol açabilen intrasellüler bir bakteridir. Kesin laboratuvar tanısı hücre kültürü ile inklüzyon cisimlerinin gösterilmesi ile konur. Hızlı tanısında direkt immünofluoresan mikroskopi ve enzim immünoessey de yaygın olarak kullanılır. Bugün NA çoğaltma yöntemleri ile *Chlamydia trachomatis*'in çok daha duyarlı bir şekilde saptandığı bir çok grup tarafından bildirilmektedir. Kullanılan yöntemler arasında ticari kitleri bulunan PCR ve LCR'da bulunmaktadır.

Yukarıda sayılan ve başlıca İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı'nda moleküler tanısı yapılmakta olan mikroorganizmalar arasından seçilen infeksiyon etkenleri listesi daha da uzatılabilir. Ancak hem yer kısıtlılığı hem de deneyim sahibi olduğumuz mikroorganizma grubu viruslar olduğu için bundan kaçınılmıştır. Örneğin *Mycobacterium tuberculosis* gibi ticari kitleri bulunan ve rutin tanıda moleküler yöntemlerin kullanıldığı kültürü güç ve uzun süren bakterilerden söz edilmemiştir. Buna rağmen halen NA çoğaltma yöntemlerinin kullanılabildiği mikroorganizmaların bir listesi yazının sonuna eklenmiştir. Liste her geçen gün büyümekte ve ilgili yöntemlerin müthiş potansiyelini yansıtmaktadır. NA yöntemleri yıllardan beridir yazılagelen dezavantajlarına (yalancı pozitiflik, yalancı negatiflik, vb.) bazı yöntemler kullanıldığında, artık sahip değilseler de, halen sürmekte olan uluslararası-çok merkezli çalışmalar bunun aksini söylemektedirler. Yani halen bu yöntemleri doğru bir biçimde kullanmak deneyimli eller ve her yönden iyi bir altyapıyı gerektirmektedir. Yine, bu yöntemlerin moleküler epidemiyoloji gibi çok önemli, ancak başlangıçta rutin kullanımda çok geçerli olmayacakmış gibi görünen ve diğer epidemiyolojik yöntemlere göre birçok yönden üstün olan yönleri de anılmadan geçilmemelidir. Öte yandan, özellikle kültürü güç olan bakteriyel infeksiyonların tanısında gündeme gelebilecek 16S ribozomal RNA genlerinin PCR ile çoğaltılmasını takiben yapılan DNA dizi analizi ile tanı, üzerinde çok çalışılan ve gelecek vaat eden bir konudur. Otomatik DNA dizi analizi cihazlarının rutin laboratuvarlarda mikroorganizma saptanması (belki de yeni mikroganizmalar!) ve tiplendirilmesi için kullanılacağı günler belki de sandığımızdan çok daha yakındadır. Herhangi birimiz bundan 10 yıl öncesinde moleküler tanıda bugün geldiğimiz noktada olacağımızı söylemiş olsaydı onunla çok büyük olasılıkla "dalga" geçmiş olurduk.

Tablo. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri ile saptanabilen mikroorganizmalar(4).

Bakteri	Rickettsia spp	Orthomyxoviridae
Actinobacillus pleuropneumoniae	Salmonella typhimurium	Influenza virus
Aeromonas hydrophila	Shigella spp	Parvoviridae
Bacillus anthracis	Staphylococcus aureus	Human parvovirus B19
Bakteriyel menenjit etkenleri	Staphylococcus aureus toksinleri	Adenoviridae
Bordatella pertussis	Treponema pallidum	Human adenovirus
Borrelia burgdorferi	Ureaplasma urealyticum	Togaviridae
Campylobacter spp	Vibrio cholerae	Rubella virus
Chlamydia trachomatis	Whipple hastalığı ile ilgili bakteriler	Picornaviridae
Chlamydia pneumoniae	Yersinia enterocolitica	Rhinovirus
Clostridium difficile	Yersinia pestis	Hepatitis A virus
Comamonas spp	**Virus**	**Mantar**
Corynebacterium diphtheriae	Herpesviridae	Blastomyces dermatitidis
E.coli (Enterohemorajik)	Herpes simplex virus I ve II	Candida albicans
E.coli (Enterotoksijenik)	Epstein-Barr virus	Coccidioides immitis
Ehrlichia spp.	Cytomegalovirus	Cryptococcus neoformans
Haemophilus influenzae	Varicella-zoster virusu	Histoplasma capsulatum
Helicobacter pylori	Human herpesviruses 6 ve 7	Pneumocystis carinii
Koliform bakteriler	Papovaviridae	Trichosporon beigelii
Legionella pneumophila	Human JC virus	**Protozoon**
Leptospira spp	Human papillomavirus	Babesia bigemina
Listeria monocytogenes	Flaviviridae	Babesia bovis
M.avium-intracellulare	Hepatit C virusu	Babesia microti
M.leprae	Enteroviruses	Entamoeba histolytica
M.tuberculosis	Hepadnaviridae	Giardia intestinalis
Mycoplasma fermentans	Hepatit B virusu	Leishmania spp
Mycoplasma genitalium	Retroviridae	Naegleria fowleri
Mycoplasma pneumoniae	HIV-1 ve HIV-2	Plasmodium falciparum
Neisseria gonorrhoeae	HTLV-1 ve HTLV-II	Toxoplasma gondii
Neisseria meningitidis	HBLV	Trichomonas vaginalis
		Trypanosoma spp

KAYNAKLAR

1- Badur S: Hepatit B virusu (HBV) infeksiyonlarında PCR tekniğinin önemi, "Türkoğlu S, Badur S (eds): *İnfeksiyon Hastalıklarının Tanısında PRC-Polimeraz Zincir Reaksiyonu*" kitabında s.11, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:22, İstanbul (1995).

2- Espy MJ, Aslanzadeh J, Smith TF: PCR detection of Herpes simplex virus DNA sequences in cerebrospinal fluid, "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology*" kitabında s.332, American Society for Microbiology, Washington (1993).

3- Espy MJ, Smith TF: PCR detection of Cytomegalovirus DNA sequences in clinical specimens, "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology*" kitabında s.351, American Society for Microbiology, Washington (1993).

4- Persing DH: In vitro amplification techniques, "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology*" kitabında s.51, American Society for Microbiology, Washington, (1993).

5- Robero JR, Rotbart HA: PCR detection of the human Enteroviruses, "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology*"' kitabında s.401, American Society for Microbiology, Washington (1993).

6- Türkoğlu S: Hepatit C virusu infeksiyonlarında polimeraz zincir reaksiyonu, "Türkoğlu S, Badur S (eds): *İnfeksiyon Hastalıklarının Tanısında PCR-Polimeraz Zincir Reaksiyonu*" kitabında s.35, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:22, İstanbul (1995).

7- Yılmaz G: HIV infeksiyonunda PCR tekniğinin önemi, "Türkoğlu S, Badur S (eds): *İnfeksiyon Hastalıklarının Tanısında PCR-Polimeraz Zincir Reaksiyonu*" kitabında s.25, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:22, İstanbul (1995).