

# İnfeksiyon Hastalıklarının Tanısında Kullanılan DNA Probları ve Nükleik Asid Çoğaltma (Amplifikasyon) Yöntemleri

Dr. İ. Halil Özerol<sup>1</sup>

Günümüzde, DNA problemleri ve nükleik asit amplifikasyon (NAÇ) yöntemleri, özellikle kültür ve serolojik testleri zor, pahalı veya bulunmayan mikroorganizmaların özelliklerini tanımlamada çok yararlıdır. Bu testlerden DNA prob temelli olanlar, özellikle dokuda mikroorganizmanın lokalizasyon ve dağılımını tespit etmek için uygundur. NAÇ yöntemleri ise klinik örnekte, belirli bir mikroorganizmanın DNA veya RNA'sının bulunup bulunmadığını tesbit için kullanılır. NAÇ yöntemleri oldukça kompleksdir. Bu komplekslikten dolayı, bu yöntemler 3 grupta incelenir; 1) hedef amplifikasyon yöntemleri: polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kendinden devamlı sekans amplifikasyon (3SR) veya iplikçik uzaklaştırarak amplifikasyon (SDA); 2) prob amplifikasyon yöntemleri: Q $\beta$  replikaz ve ligaz zincir reaksiyonu (LCR); 3) bileşik prob veya dallanmış prob (bDNA) yöntemleri. Moleküler yöntemlerdeki bu ilerlemeler, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında devrim niteliğindedir. Bu derlemede; yeni yöntemler ile bunların avantaj, dezavantaj ve uygulama alanları tartışılmıştır. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1997;4(3):329-344]

**Anahtar Kelimeler:** Mikrobiyoloji, diagnostik testler, PCR, LCR, TAS/3SR, SDA, Q $\beta$  replikaz, bDNA, DNA problemleri

## DNA probes and nucleic acid amplification techniques to diagnose infectious diseases

At present, DNA probes and nucleic acid amplification techniques are most useful for the characterization of microorganisms for which culture and serological methods are difficult, extremely expensive, or unavailable. DNA-probe based assays are particularly well suited for in situ hybridization in tissue in which the localization and distribution of the microorganisms must be ascertained. Nucleic acid amplification procedures are complex methods that determine whether DNA or RNA from a particular organism is present in the clinical specimen. Because of this complexity, it is useful to assign such methods to one of three general categories; 1) target amplification systems such as polymerase chain reaction (PCR), self-sustaining sequence amplification (3SR), or strand displacement amplification (SDA); 2) probe amplification systems, which include Q $\beta$  replicase or ligase chain reaction (LCR); and 3) signal amplification, in which the signal generated from each probe molecule is increased by using compound probes or branched-probe technology (bDNA). Recent advances in molecular technology may revolutionize the clinical microbiology laboratory. These new techniques, their advantages and disadvantages, and some of the recent applications have been discussed in this review. [Journal of Turgut Özal Medical Center 1997;4(3):329-344]

**Key Words:** Microbiology, diagnostic tests, PCR, LCR, TAS/3SR, SDA, Q $\beta$  replicase, bDNA, DNA probes

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında DNA problemlerinin ve NAÇ yöntemlerinin kullanılmaya başlanmasından

sonra infeksiyon hastalıklarının tanısı daha kısa zamanda yapılmaya başlanmıştır (1,2). Günümüzde

<sup>1</sup> İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

DNA problemleri (Tablo 1), genellikle laboratuvarında üretilen mikroorganizmaların hızlı tanımlanması amacıyla kullanılmasına rağmen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ligaz zincir reaksiyonu (LCR) ve transkripsiyon bazlı amplifikasyon sistemleri (TAS) hızlı tanımlama yöntemleri olarak kabul edilmemektedir. Nükleik asitlerin in vitro çoğaltılması (Tablo 2) amacıyla hedef, prob veya sinyal amplifikasyon yöntemleri olmak üzere başlıca 3 yöntem kullanılmaktadır (3). Bu yöntemlerden, hedef nükleik asit dizisinin ve bu diziyeye özgün primer'ların çoğaltılmasında veya enzim/radyoaktif olarak işaretlenen problemlerin hedefe bağlandıktan sonra yaydığı sinyallerin tespit edilmesinde yararlanılmaktadır. Şu anda sadece kültür ve serolojik testleri zor, pahalı veya mevcut olmayan bazı mikroorganizmaların tespiti amacıyla kullanılan bu yeni ve güçlü yöntemler ile ilgili bazı problemler aşılabilirse gelecek yıllarda, başta viroloji laboratuvarı olmak üzere diagnostik laboratuvarların vazgeçilmez bir parçası olacaktır.

## DNA PROBLARI

Prob, spesifik DNA baz çiftlerine bağlanan ve tipik olarak 6-18 baz uzunluğunda küçük bir DNA (oligonükleotid) parçasıdır. Oligonükleotidler, radyoaktif izotop veya bir boya ile etiketlenerek direkt olarak spesifik baz dizilerinin tespit edilmesinde kullanılmaktadır. DNA problemleri, özellikle klasik yöntemler kullanılarak üretilen mikroorganizmaların hızlı tanımlanması amacıyla klinik mikrobiyoloji laboratuvarında önemli bir rol oynamaya başlamıştır.

DNA problemleri; katı, sıvı ve insitu hibridizasyon yöntemleri şeklinde uygulanmaktadır (Tablo 1).

**1. İn situ hibridizasyon:** İnfekte dokuda yapılır. Genellikle parafine gömülüp formalinle fikse edilen

**Tablo 1.** Mikroorganizmaların tespit edilmesi ve özelliklerinin tanımlanmasında kullanılan hibridizasyon yöntemleri

### İn situ hibridizasyon

#### Katı-faz hibridizasyon

- Slot blot
- Dot blot
- Southern blot
- Northern blot

#### Sıvı-faz hibridizasyon

- Hibridizasyondan korunma (HPA)

doku kesitleri kullanılır. Bu yöntemde proba reaksiyona girebilmesi için doku kesitlerindeki hedef DNA denatüre edilmeli ancak hücre yapıları korunmalıdır. Denatürasyon sırasında hücre yapıları da etkilenebildiği için in situ hibridizasyon yöntemlerinin sensitivitesi düşüktür.

**2. Katı faz hibridizasyon yöntemleri:** Slot ve dot blot yöntemleri sadece araştırma amacıyla bazı laboratuvarlarda kullanılan DNA prob hibridizasyon yöntemleridir. Bu yöntemlerde önce sağlam hücre parçalanır. DNA denatüre edilir, dot veya slot pozisyonunda vakum altında naylon membrandan geçirilerek membrana tespit edilir. Bu membran DNA'yı gösteren prob kapsayan hibridizasyon solusyonuna daldırılır. Bağlanmayan raportör problemler yıkanarak uzaklaştırılır ve bağlanan problemler tespit edilir. *Dot veya slot blotun avantajları;* multipl örneklerin bir defada çalışılarak bir tek filtrede taranabilmesidir. Sandwich veya capture hibridizasyon ile birlikte modifiye edilebilir. Bu durumda hedef nükleik asitte farklı yerlere bağlanan iki prob kullanılır. Bir prob membrana bağlanır ve örnekteki hedef nükleik asiti bağlar. İkinci prob etiketlidir ve nükleik aside bağlandıktan sonra sinyal yayıcı olarak görev yapar. Bazı human papillomavirüslerin taranması ve tespit edilmesi amacıyla slot blot testleri kullanılmaktadır. Southern veya Northern prob'lar raportör problemlere bağlanan DNA fragmanlarının çapının tespit edilmesini sağlayan katı faz hibridizasyon yöntemleridir. Northern blot, Southern blot'un bir varyasyonu olup burada kullanılan raportör prob DNA yerine RNA'yı tespit etmektedir. Bu yöntemlerin uygulanabilmesi için DNA veya RNA'nın saflaştırılması gerekir. Southern blot'ta örnekteki DNA izole edildikten sonra restriksiyon endonükleaz enzimleri ile parçalanarak agaroz jel elektroforez yapıp fragmanlarına ayrılır. Northern blot'ta aynı işlemler RNA için yapılır. Her iki yöntemde de nükleik asitlerin spesifik bir proba hibridize olabilmesi için nitrosellülöz veya naylon membrana transfer edilir. Bu prosedürlerin *dezavantajları;* fazla kompleks olmaları, örnekte büyük miktarda nükleik asit bulunmasını gerektirmeleri ve testin tamamlanmasının uzun zaman almasıdır.

**3. Sıvı faz hibridizasyon yöntemleri :** Nükleik asit ve problemler sıvı fazda hibridize edilir. Sıvı fazda hibridizasyon hızı artmaktadır. Kullanılan prob tek zincirli DNA (ssDNA)'dır. Solusyonda oluşan hibridlerin miktarı, ssDNA'nın S1 nükleaz ile

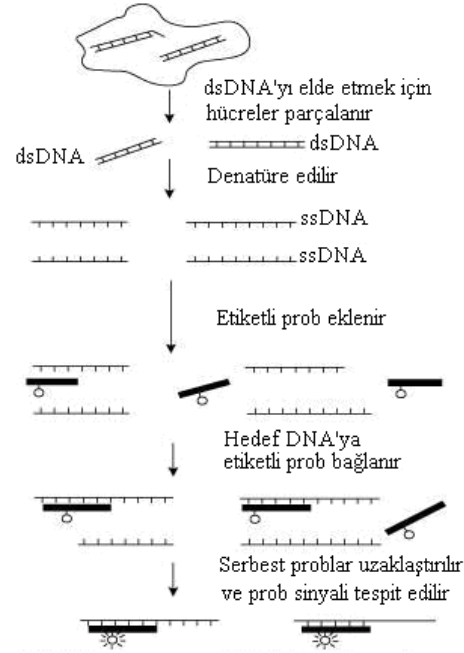
sindirilmesi ve arta kalan çift zincirli raportör prob hibridlerin triklorasetik asitle presipitasyondan veya direkt olarak çift zincirli hibridlerin hidroksiapatid kolonlarına spesifik olarak bağlanmasından sonra belirlenir. Hidroksiapatid kolonlarına selektif olarak çift zincirli DNA (dsDNA) bağlanmaktadır. Sıvı faz hibridizasyon yöntemlerinde en sık kullanılanı, hibridizasyondan korunma testidir (hibridization protection assay veya HPA). HPA'da akrininium ester, DNA probuna bağlanır ve bu prob ile hedef DNA hibridize olur. Daha sonra alkali ile muamele edilir. Peroksid eklendikten sonra akrininium esterini tespit edilebilen ışık yayar. Eğer akrininium ester-etiketli DNA probu serbest formda ise hidrolize olur ve ışık yaymayan bir forma dönüşür. HPA assay birkaç saat içinde ve bağlanmamış aşırı ssDNA'nın uzaklaştırılmasını veya probun bağlandığı dsDNA komplekslerinin izolasyonunu gerektirmeden uygulanabilir.

**Avantaj ve dezavantajları:** Prob yöntemlerinin en büyük avantajı kültür veya tanımlanması zor olan mikroorganizmaların genomlarını tespit edebilmesi veya bu mikroorganizmaları tanımlayabilmesidir. **Dezavantajı** ise; bir defada tespit edilebilen mikroorganizma sayısının az olması, test süresinin uzun olması, nadir patojenlerin tanımlanabilmesi ve duyarlılık paternlerinin çıkarılabilmesi için birlikte kültür yapılmasını gerektirmesi, yanlış negatif ve pozitif sonuçlar alınabilmesidir.

Bu konularda yeni ilerlemeler sağlanmış ve DNA prob yöntemleri, kültürde üretilebilen birçok mikroorganizmanın tanımlanmasında sıklıkla uygulanmaya başlanmıştır. Ancak, bu yöntem halen direkt hasta örneklerinden elde edilen mikroorganizmaların tespitinde minör bir role sahiptir.

**Akrininium etiketli proplar:** Moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmelerden biri kemiluminesan özellikteki akrininium ester ile etiketlenen tek zincirli DNA (ssDNA) kullanan prob bazlı bir yöntemin geliştirilmesidir. Bu yöntemde kullanılan ssDNA mikroorganizmanın hedef ribozomal RNA (rRNA)'sının komplemanteridir. Akrininium etiketli prob, ya hastadan elde edilen ve lize edilen materyallere direkt olarak ya da kültürde üretilen mikroorganizma kolonileri üzerine eklenir. Bu materyallerde hedef rRNA mevcutsa dayanıklı bir DNA-RNA hibridi oluşur. DNA-RNA hibridi oluşturamayan etiketli proplar, hidrolizleyici bir ajanla kombine edilen magnetik polikatyonik mikrobocuklar kullanılarak hibridize DNA'dan

ayrılır. DNA-RNA hibridleri, bu ajandan etkilenmez ve kemiluminesan özellikleri devam eder. Absorbe olan hibridler ise magnetik partiküllere bağlandığı için magnetik ayırma birimi tarafından ayrılır. Etiketli DNA-RNA hibridleri tespit edilir ve bir kemiluminometre kullanılarak kemiluminesans ölçülür.



Şekil 1. DNA prob hibridizasyonunun temel basamakları.

**Uygulamaları:** Akrininium etiketli prob yöntemleri günümüzde bir çok laboratuvarlarda *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MAC) ve *Mycobacterium avium-intracellulare* (4)'den başka *Histoplasma capsulatum* ile *Cryptococcus neoformans* (5,6) dahil bazı fungusların tanımlanmasında kullanılmaktadır. İlave olarak, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* gibi daha sık rastlanan mikroorganizmalar da hızlı olarak tanımlanabildiği gibi hasta örneklerinde hem *Chlamydia trachomatis* hem de *N. gonorrhoeae*'nin tespitinde de kullanılmaktadır (7,8). Bu yöntem çok duyarlı ve çok spesifiktir. Klamidyia prob assay'inin duyarlılığı %93.9 ve spesifikliğı %99.1 iken gonokok prob assay'inin sonuçları sırasıyla %93.3 ve %99 olarak saptanmıştır. *C. trachomatis* tanımlanmasında bu tekniğin duyarlılığı %75.5 ila %97.3 arasında (9) iken rutin kültür yöntemlerinininki %80 ila %96.7 arasındadır (10).

*Diğer DNA problemleri:* Akridinium etiketli problemlerden başka diğer kemiluminesan özellikte bileşikler de tanımlanmıştır (11). Non-izotopik tespit yöntemlerinde enzim etiketli antikorlar kullanılmaktadır. Etiketli antikorlar proba eklenen veya bağlanan bir bileşiğe bağlanmaktadır. Non-izotopik tespit sistemlerinin geliştirilmesi ile DNA prob yöntemlerinin uygulama alanları genişlemiş, birçok mikroorganizmanın tespit ve/veya tanımlanmasında rutin yöntemlere alternatif bir yöntem haline gelmiştir.

## Nükleik asit amplifikasyon (NAÇ) yöntemleri

**A. Hedef amplifikasyon yöntemleri:** Bu yöntemler hedef molekülleri enzimatik olarak replike ederek kolayca tespit edilebilir seviyelere getirirler. Hedef amplifikasyon\* yöntemlerinde, hedefe spesifik sekans bilgileri amplifikasyon ürününe taşınmaktadır. Bu yöntemlerle patojen tanımlanabilmekte ve reaksiyon sonunda hedef sekansında artma ortaya çıkmaktadır.

**1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):** Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA'nın hızlı çoğaltılması için kullanılan bir tespit yöntemidir. DNA kopyalarının oluşturulmasında, küçük bir DNA primer<sup>&</sup> ve DNA polimeraz<sup>#</sup> enzimi kullanılır. RNA dizileri, bir

transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya çevrilmeleri halinde dolaylı olarak amplifiye edilebilir. PCR, günümüzde birçok tıbbi araştırmalara muazzam katkılar sağlamıştır. Bunlardan biri zor üreyen ve kültürü yapılamayan mikroorganizmaların tespit edilmesidir (12-15).

PCR, 3 basamaklı bir işlemin tekrarlanması esasına dayanır: 1) örneğin ısıtılması ile çift zincirli DNA (dsDNA)'nın tek zincirli DNA (ssDNA) haline getirilmesi (denatürasyon), 2) örneğin soğutulması ile primer'ların ssDNA'ya bağlanması (annealing) ve 3) primer'ların enzimatik olarak ssDNA'nın komplementeri olarak bağlanıp uzaması (ekstansiyon) (Şekil 2). Uzamadan sonra, orijinal DNA segmenti ve yeni oluşan komplementer DNA zinciri yeni kalıplar olarak kullanılırlar. Bu nedenle, her PCR siklusu mevcut spesifik DNA miktarını iki katına çıkarır. Amplifiye olan ürünlerin hızlı tespit edilebilmesi nedeniyle PCR diagnostik amaçla daha sık kullanılmaya başlanmıştır.

Yukarıda tanımlanan tekniğe ilaveten ters problema PCR (reverse-probing PCR), jel elektroforezi ve Southern hibridizasyon yapmadan ürünlerin hızlı tespit edilebilmesini sağlar (16). Bu yöntemde problemleri yakalayıp hibridize etmek için etiketli primer'lar kullanılır. Bu nedenle amplifiye PCR ürünleri etiketlidir. Kalorimetrik oligonükleotid ligasyon assay denen diğer bir yöntemde ise yine etiketli problemler kullanılmakta ancak bu problemler amplifiye ürüne bağlandıktan sonra birlikte bağlı kalmaktadır. Daha sonra etiketli problemler ve amplifiye ürünler elde edilir ve ELISA uygulanır (17).

*Avantajları:* PCR'in avantajı, tüm genom yerine sadece primer'a spesifik hedef baz çiftleri kullanarak spesifik DNA baz çiftlerini çoğaltmasıdır. Bu yöntemle 25'ten daha az baz çifti 10.000 baz çiftine kadar çoğaltılabilmektedir (Tablo 2). Buna ilaveten PCR çok hızlı bir yöntemdir. Bir DNA parçası, 3 saat içinde 1 milyon kez kopyalanabilir.

PCR'in spesifikliği "hot start" amplifikasyon ve "nested" PCR denen bazı yöntemlerle artırılmıştır. Hot start amplifikasyon, reaksiyon tüp ısısı yükseldikten sonra polimeraz enzimi, magnezyum veya primer'lar gibi esansiyel komponentlerden herhangi birisinin eklenmesiyle uygulanmaktadır. Bu nedenle nonspesifik bağlanma ihtimali azalmaktadır. Nested PCR yönteminde ise orijinal primer'lara ikinci bir primer seti daha eklenmektedir. Bu nedenle hedef

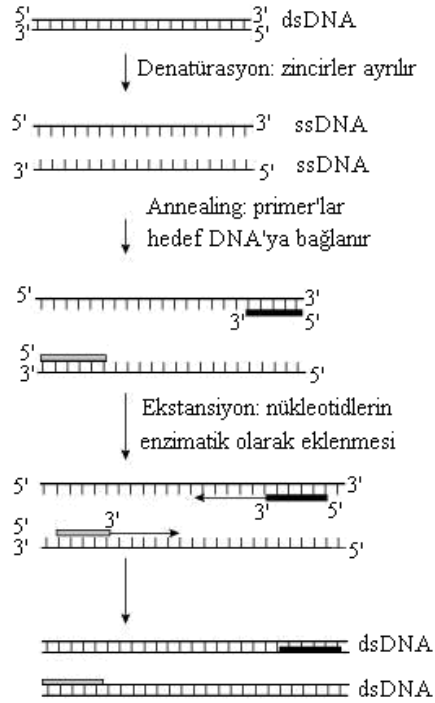
**Tablo 2.** İn vitro NAÇ yöntemleri

Yöntemler	Kullanılan enzim(ler)
<b>Hedef amplifikasyon</b>	
• PCR	Termostabil DNA polimeraz
• TAS	Revers Transkriptaz RNA Polimeraz
• 3SR	Revers Transkriptaz RNase H RNA Polimeraz
• SDA	DNA pol., rest.endonükleaz
<b>Prob amplifikasyon</b>	
• LCR	Termostabil DNA Ligaz
• Qβ replikaz	Qβ replikaz
<b>Sinyal amplifikasyon</b>	
• Bileşik prob	Yok
• BDNA prob	Yok

\* Amplifikasyon: spesifik DNA baz dizilerinin kopya sayılarının artırılması işlemidir.

& Primer: Proba benzer fakat etiketli değildir. Primer'lar, amplifikasyon tekniklerinde DNA veya RNA baz dizilerinin kopyalanmasını başlatmak için kullanılan spesifik sentetik oligonükleotidlerdir.

# Polimeraz: DNA polimeraz, PCR ve diğer moleküller metodlarında kullanılan ısıya dayanıklı bir enzimdir. Hızla DNA kopyalarının oluşmasını ve zincirin uzamasını sağlar.



**Şekil 2.** İlk PCR siklusu DNA baz çiftlerinin iki katına ulaşmasına neden olur. Bunlar sonraki siklus sırasında daha fazla DNA kısımlarının sentezlenebilmesi için kalıp olarak kullanılır.

fragmana cevap veren amplifikasyon ürünlerinin subseti tanımlayıcı kabul edilmektedir.

**Dezavantajları:** PCR'in yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar verebilmesi dezavantajlarını teşkil eder. Yanlış negatif sonuçlar ortamda bulunabilen inhibitörlere veya yetersiz sayıda primer kullanılmasına bağlıdır.

PCR uygulamalarında sakınılması gereken en önemli problem yanlış pozitifliklerdir. Yanlış pozitif sonuçlar, özellikle bir önceki deney sırasında amplifiye edilen ve ortamda kalan DNA kalıntılarının (bunlara amplikon adı verilir) veya yabancı DNA'nın (kontaminasyon) amplifikasyonuna sekonder olarak meydana gelir. Laboratuvar prosedürlerinin titizlikle uygulanması ve yeni geliştirilen çeşitli yöntemlerin uygulamaya girmesi sonucunda amplikonlar ve yabancı DNA ile kontaminasyon problemi azaltılabilmektedir. Bu yöntemlerden biri, fotoaktif primidinler ile reaksiyon veren izopsoresalen derivelerinin kullanılmasıdır. Bu işlem sonunda oluşan çapraz bağlanmalar polimeraz uzamasını bloke eder (18). Diğer bir yöntemde ise urasil DNA glikozilaz enzimi kullanılır. Bu enzim urasil bazının ssDNA veya dsDNA şeker fosfat iskeletindeki urasil bazını ayırır

ve böylece DNA polimeraz ile replike olamaz. Timidin yerine urasil ile oluşan amplikon veya sentezlenen DNA primer'ı urasil DNA glikozilat eklenerek sterilize edilebilir ve daha sonra normal PCR ısılarında inaktive edilirler (19).

**Uygulamaları:** PCR, kontaminasyonu önleme yöntemlerinin geliştirilmesi ve non-izotopik tespit yöntemlerinin iyileştirilmesi sonucu mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha büyük rol oynamaya başlamıştır. Zor üretilen birçok mikroorganizmanın tesbit ve tanımlanmasında kullanılır. DNA amplifikasyon yöntemleri, başta PCR olmak üzere, özellikle virus yükünün kantitatif ölçülmesinde (20,21), mRNA'larının gösterilmesinde (22), antiretroviral tedavide direncin genetik belirteçlerinin incelenmesinde (23,24), epidemiyolojik araştırmalar ve tiplendirmelerde (25,26) ve yeni virusların ortaya çıkarılmasında (27,28) uygulama alanına girmişlerdir.

PCR uygulanarak balgam ve beyin omurilik sıvısında *M. tuberculosis*'in duyarlı ve spesifik hızlı tanısı yapılabilmektedir. Yapılan bir çalışmada kültürde pozitif bulunan 51 balgamdan 50'sinde PCR'in de pozitif olduğu buna karşılık kültür negatif 68 balgam örneklerinden sadece birinde PCR'in pozitif olduğu tespit edilmiştir (29).

Günümüzde viroloji laboratuvarlarında doku kültürü gibi identifikasyon yöntemlerinin yerine ekonomik olması nedeniyle PCR bazlı kitler kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile HIV-1 (human immunodeficiency virus type-1) (30-32), hepatitis C virus (33), cytomegalovirus (34), papillomavirus (35), ve klamidya türlerinin (36) tespit ve tanımlanması yapılabilmektedir.

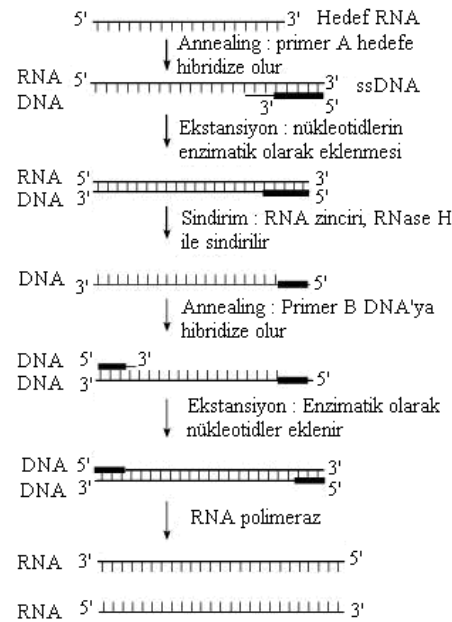
**Kültürü yapılamayan patojenlerin tespit edilmesi amacıyla PCR'in kullanılması:** PCR ile birlikte 16S ribozomal RNA (16S rRNA) bazlı moleküler yöntemlerin kullanılması, kültürü yapılamayan bazı mikrobiyal patojenlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu teknik ilk kez, basiller angiomatosis etiyolojik etkenini tespit etmek amacıyla Relman ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (37). Kısaca özetlenecek olursa, infekte dokudan DNA ekstrakte edilir ve bakteriyel 16S rRNA genleri, "broad-range" primer'lar kullanılarak amplifiye edilir. Daha sonra amplifiye edilen ürünlerin baz dizileri tespit edilir ve 16S rRNA'nın değişken bölgelerinin analiz edilmesiyle diğer mikroorganizmalarla ilişkileri tayin edilir (38). Bu yöntem ile Whipple hastalığının etiyolojik etkeni tanımlanabilmektedir (39).

**2. Transkripsiyona dayalı amplifikasyon yöntemleri (TAS/3SR):** TAS, ilk kez 1989 yılında Kwoh ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve HIV-1 RNA'sında vif genlerini saptamak amacıyla kullanılmıştır (40). TAS, revers transkriptaz (RT) ve RNA polimeraz enzimleri kullanılarak DNA sentezi ve RNA transkripsiyonunun gerçekleştirilmesi esasına dayanan 2 basamaklı bir tespit yöntemidir. İlk basamakta; hedef nükleik aside komplementer olan bir DNA molekülü (cDNA) sentezlenir. İkinci basamakta ise yeni oluşan cDNA kalıp olarak kullanılarak in vitro transkripsiyon meydana gelir. Bu yöntemde, hedef olarak denatüre edilen DNA veya RNA zinciri ve bir ucunda hedefe spesifik sekanslar ve diğer ucunda polimeraz bağlanma yeri bulunan primerler kullanılır. Bu primerlerin 5' ucunda T7, T3 ya da SP6 RNA fajlarının polimeraz enzimlerinin promoter bölgelerini içeren diziler bulunur (41). Primer'lar hedefe bağlandıktan sonra RT enzimi aracılığı ile hedef baz dizisini uzatmaya başlar. Hedef nükleik asite komplementer (tamamlayıcı) bir DNA molekülü (cDNA) sentezlenir. İkinci basamakta; RNA-DNA veya DNA-DNA dubleksleri ısı ile denatüre edilerek yeni üretilen cDNA'lar ayrılır ve kalıp olarak kullanılır. Yeniden RT enzimi eklenir ve ikinci ipçikğin oluşması sağlanır. Bu ipçiklerin birleşmesi ile bir dsDNA oluşur. Daha fazla dsDNA üretebilmek için daha çok RT eklenir. RNA polimeraz eklenmesi multipl RNA kopyalarının çıkarılmasını sağlamaktadır. Çoğaltılmış RNA dizileri çeşitli hibridizasyon yöntemleri ile saptanabilir.

TAS yönteminde ortaya çıkan RNA-DNA dublekslerinin ayrılmasında ısı denatürasyonu kullanıldığı için ısıya dayanıksız enzimlerin her yeni döngüde tekrar eklenmeleri gerekir (40). 1991 yılında, Jean Compton (42) ve Thomas R.Gingeras ve arkadaşları (43), RNA-DNA dublekslerini ayırmak için *Escherichia coli* RNase H enziminin kullanılması ile bu problemin ortadan kalktığını bildirmişlerdir. TAS'ı modifiye eden Jean Compton, geliştirdiği teknolojiye NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) (42), Thomas R.Gingeras ve arkadaşları (43,44) ise 3SR (Self Sustained Sequence Replication) adını verdiler. NASBA ve 3SR yöntemleri, birçok açıdan retroviral RNA replikasyonuna benzemektedir (45). 3SR, TAS'tan farklı olarak, siklus halinde uygulanmaz, çok hızlıdır ancak PCR ve LCR'dan daha az duyarlıdır. Reaksiyon izotermal koşullarda gerçekleşir ve hedef RNA, *Escherichia coli* RNase H'ı ile parçalanır. Reaksiyon başında denatürasyon etabı uygulanırsa DNA da

amplifiye edilebilir. TAS reaksiyonunda oluşan RNA-DNA dubleksleri RNase H ile parçalanır ve her iki ucunda bir polimeraz bağlanma yeri olan dsDNA elde edilir. dsDNA, reaksiyona tekrar giren RNA sentezi için bir kalıp olarak kullanılarak reaksiyonu devam ettirir (Şekil 3).

**Avantaj ve dezavantajları:** 3SR'nin esas avantajı hızlı olması (PCR'dan çok daha hızlıdır) ve direkt olarak RNA'yı amplifiye etmesidir. Buna ilave olarak termal döngü aygıtı (thermocycler) gerekli değildir. Hedef RNA'nın DNA'dan tümüyle arındırılması gerekmez (3). On beş dakika içinde siklus gerektirmeden  $10^5$  kopya meydana gelmekte ve yarım saatte hedef nükleik asit  $10^8$  kez çoğaltılabilmektedir (41). Tüm amplifikasyon yöntemlerinde olduğu gibi,



**Şekil 3.** 3SR amplifikasyonunun ilk siklusu. A ve B primer'ları hedefe spesifik baz dizilerine ve revers transkriptazın etkisi için T7 RNA polimerazı kodlayan bölümlere sahiptir. Revers transkriptaz ve RNA polimeraz, DNA veya hedef RNA'yı amplifiye etmek için birlikte çalışır.

3SR de kontaminasyondan etkilenir. Prosedürün spesifikliği düşüktür. Çünkü reaktanlar diğer amplifikasyon yöntemlerinden daha azdır. Bunun nedeni enzimlerin ısıya dayanıksız olmasıdır. Termotabil RNA polimeraz ve RT kullanılabilirse 3SR yöntemi seçkin diagnostik hedef amplifikasyon yöntemi olarak PCR'dan daha üstün hale geçecektir.

**Uygulamaları:** Günümüzde 3SR amplifikasyon yöntemi HIV tespiti için odaklanmıştır (40,46). Periferik kan monositlerinde HIV tespiti yönünden

3SR ve PCR'in sensitivitesi birbirine yakındır (sırasıyla %93 ve %95) (46). HIV RNA'yı tespit edebilmek için 3SR, nadir bir element ile amplifiye olan hedefin polistiren boncuk capture uygulanan tespit yöntemi ile, kelat etiketli oligonükleotid problemlerle ve zamanla azalan floresan tespit yöntemleri ile kombine edilmiştir (47). Bu teknik plazmada HIV-1 RNA tespiti için plazma kültüründen çok daha hızlı ve onun kadar sensitiftir. Sensitivitesinin, 12 HIV-1 RNA kopyasından daha az olduğu tespit edilmiştir. Çocuklarda, 3SR kullanılarak plazmadaki viral RNA'nın tespit edilmesi çok kolaylaşacaktır. Çünkü infantlardan toplanan çok küçük hacimdeki örneklerle çalışılabilmektedir. Ayrıca, RNA ölçümleri, viral aktivite ve replikasyonu çok daha doğru bir şekilde yansıtmaktadır (47).

**3. İplikçik uzaklaştırarak amplifikasyon (Strand Displacement Amplification, SDA):** Bu yöntem ilk kez 1991 yılında "Becton Dickinson" firması tarafından geliştirilmiştir (48,49). SDA, hedefin eksponansiyel olarak çoğaltılması için spesifik primer'lar, bir DNA polimeraz ve restriksiyon endonükleazlar kullanan izotermal DNA amplifikasyon yöntemidir. İki saatlik bir sürede hedefi  $10^7$  katına çoğalttığı bildirilmiştir (49). SDA yönteminin temeli, restriksiyon endonükleaz HincII ile spesifik yerlerin kesilmesine dayanır. Primer'ların 5' uçlarında yaklaşık 20 nükleotidlik herhangi bir DNA dizisi ve bunu izleyen uygun bir restriksiyon enzim bölgesi yer alırken 3' ucuna yakın bölgede hedef DNA'ya komplementer nükleotid dizisi bulunur. Restriksiyon enzimlerinin çoğu çift iplikçikli DNA molekülü üzerinde kendilerine özgü dizileri tanır ve bu bölgelerden DNA'yı keserler. Kesilen DNA ipçığı, ekzonükleaz negatif DNA polimeraz (Klenow fragmanı) tarafından kullanılarak uzaklaştırılır ve primer için tek iplikli hedef DNA oluşur. Aynı zamanda, geride kalan kalıp iplikçik ekzonükleaz negatif Klenow fragmanı tarafından kullanılarak yeni DNA ipçığı oluşur. Normal olarak, restriksiyon enzimlerinin parçalanma ürünleri çift iplikli DNA üretir. Bunlar SDA için uygun kalıplar değildir. DNA polimerazın iplikçik uzaklaştırma ve DNA sentezi yapabilmesi için reaksiyon ortamına dNTP ler yanısıra alfa-thio (alfaS) dNTP de konur. Tipik bir SDA reaksiyonunda dCTF, dGTP, dTTP ve dATP (alfaS) kullanılır. Böylece polimeraz enzimi kesdiği onarıırken "adenin" yerine alfa-thio adenin kullanır ve komşu nükleotid ile phosphorothioate bağları oluşmuş olur. Alfa-thio nükleotidler endonükleazlar ile kesilemediklerinden, yalnızca tek bir iplikçığın

kesilmesi sağlanmış olur. Ayrıca, SDA tekniğinde kullanılan restriksiyon enzimlerinin hemiphosphorothioate'lı bölgelerde DNA ipçiklerini kesme özellikleri vardır. Bu özellikteki restriksiyon enzimleri arasında Hinc II, Hind II, Ava Nci I ve Fnu 4HI yer almaktadır (48). Bunlardan en sık kullanılanı Hinc II enzimidir.

Kesi yerinde hemifosforotioate'lı ipçik ekzonükleaz negatif Klenow fragmanı tarafından kalıp olarak kullanılarak DNA sentezlenir (Şekil 4). SDA'nın son versiyonunda reaksiyon iki adımda gerçekleştirilmiştir (49). Birinci reaksiyonda orijinal hedef sekansının her iki ucunda bulunan kesilebilen HincII yeri ile hemifosforotioate formuna çevrilir. İkinci basamakta transforme hedef sekansında eksponansiyel amplifikasyon meydana gelir.

Tekrarlanan, kesme/polimerizasyon-iplikçik uzaklaştırma basamakları sonunda, hedef DNA'nın çoğaltılması sağlanmış olur. Bu yöntemle 5 saat içinde hedef DNA bir milyon kez çoğaltılabilmektedir (48). Özetle, tipik bir SDA tepkimesi şu basamaklardan oluşmaktadır; 1) primer'ların hedef DNA'ya bağlanması 2) polimerizasyon 3) hemiphosphorothioate Hinc II bölgesinden kesik oluşumu 4) Hinc II'nin kesik bölgesinden ayrılması 5) kesik bölgesinin ekzonükleaz negatif Klenow enzimi tarafından tamiri ve arkadaki iplikçığın uzaklaştırılması.

*Avantaj ve dezavantajları:* SDA reaksiyonu kompleks olmasına rağmen her reaksiyon basamağı aynı zamanda meydana gelir ve reaksiyonu başlatmak için ilave bir işlem gerekmez. Başlangıçta  $95^{\circ}\text{C}$ 'de denatürasyon yapma dışında SDA reaksiyonları izotermal koşullarda gerçekleşir.  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik ısı kontrol cihazı dışında özel laboratuvar donanımı gerekmez. Ayrıca, SDA tek ya da çift iplikli DNA ile yapılabilir. SDA ile, yeterince amplifiye edilen hedef DNA'nın miktarı kısıtlanabilir. Hedef uzunluğundaki her 50 nükleotid artışı amplifikasyon seviyesini yaklaşık 10 kat azaltır. Yöntemi geliştirenler bu olayın tek iplikli kalıplara (burada ayrılma gerekmez) göre çift iplikli kalıplar (burada bir ipçığın uzaklaştırılması gerekir) için DNA polimerazın daha az etkin olması ile ilgili olduğunu belirtmektedirler. Bu olay SDA'nın fonksiyonelliğini ciddi olarak etkilemezken amplifikasyondan sonra dekontaminasyon işlemlerini etkilemektedir. Tüm enzime katalizlenen nükleik asid amplifikasyon işlemlerinde olduğu gibi, SDA reaksiyonunda da, kullanılan örneklerin daha önceden amplifiye edilen DNA ile kontamine olması ciddi bir

problemdir. PCR ile karşılaştırılınca SDA'da dekontaminasyon daha zor olabilir. Çünkü daha kısa hedef sekanslarının (50-100 bp) inaktive edilmesi daha zordur.

SDA yöntemi, kompleks reaksiyonlardan oluşur. Yöntemin etkin kullanılabilmesi için hedef DNA'da kullanılan restriksiyon enzim bölgesini içermemesi, çoğaltılacak bölgenin 40-50 baz çiftinden uzun olmaması gerekir (3). Reaksiyonlar genellikle 37-42°C arasında yürütüldüğünden, bu ısılarda non-spesifik amplifikasyonlar olasıdır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için genellikle reaksiyonlara DMSO ya da gliserol gibi organik çözücüler katılmaktadır.

Son zamanlarda, SDA yöntemi, klinik örneklerde ve alkali ile muamele edilen balgam örneklerinde *M. tuberculosis* DNA'sını amplifiye etmekte kullanılmaktadır (50). SDA yöntemi ile *M. tuberculosis*'in 40 farklı izolatının hedef sekansı kolayca tespit edilmekte ve balgam örneklerinden elde edilen hedef DNA için mükemmel sensitivite göstermektedir. Gelecek yıllarda SDA'nın mikrobiyolojik uygulamalarının artması beklenmektedir.

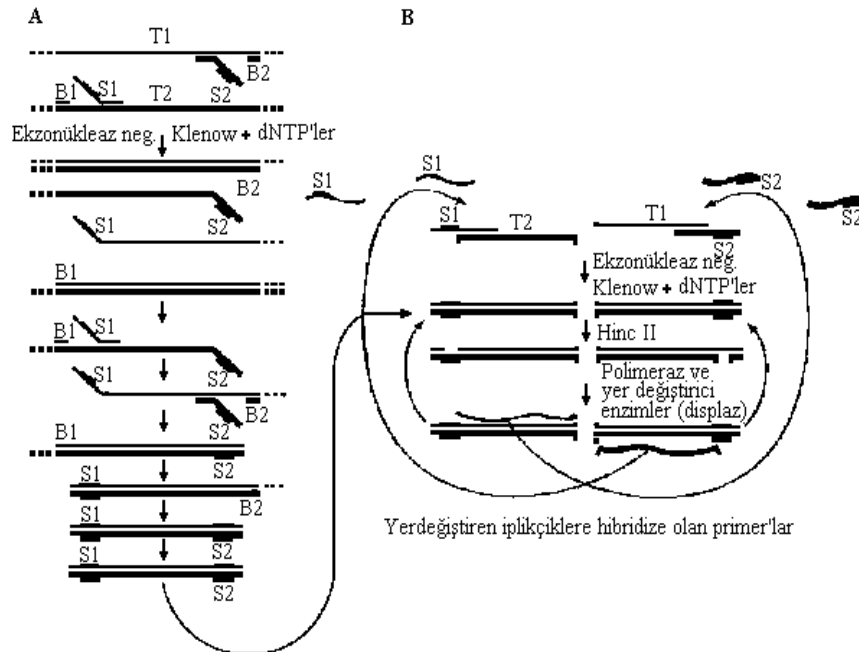
**B. Prob amplifikasyon yöntemleri:** Prob amplifikasyon yöntemlerinde, hedef nükleik asit dizileri yerine bu dizileri saptamak için kullanılan oligonükleotid problemler çoğaltılmaktadır. Bu nedenle, hedef nükleotid dizilimi hakkında bilgi vermez.

Ancak, patojenler için özgün dizilerin varlığını saptayarak tanı konulmasını sağlar.

**1. Ligaz zincir reaksiyonu (LCR):** Ligaz veya DNA ligaz, birleşme sonlarında DNA'nın 2 parçasını birleştirmede kullanılan ısıya dayanıklı bir enzimdir.

Ligaz zincir reaksiyonu, ilk kez 1988 yılında Landegren ve arkadaşları (51) tarafından tanımlanan PCR gibi hedef baz dizilerinin tespit ve amplifiye edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu işlem sonucunda reaksiyon ürünleri eksponansiyel olarak birikir (52). Bu yöntemde, 2 küçük DNA primer'ı ve bu iki oligonükleotidi birbirinin ucuna bağlayan termostabil ligaz enzimi kullanılır. Denatürasyon, annealing ve ligasyon (bağlama) sikluslarından sonra DNA kopyası oluşur. Isı ile denatüre edilip kalıp DNA'dan oligonükleotidlerin ayrılması sağlanır. Daha sonraki siklusa birbirine bağlanan oligonükleotid çiftleri ve orijinal baz dizileri kalıp olarak kullanılır (Şekil 5). LCR yönteminde kullanılan ilk primer'lar kalıp olarak kullanıldığı için ikinci primer'lar birinci primer'lara tamamen komplementerdir. İlk primer'lar amplifiye edilemezse ikinci primer'lar da amplifiye edilememektedir. Bu nedenle, LCR yöntemi özellikle hedef nükleik asitlerdeki nokta mutasyonların saptanması için yararlıdır.

PCR ve LCR ile ilgili yeterli klinik çalışma olmamasına rağmen bu iki teknik karşılaştırılınca, diagnostik çalışmalarda LCR, PCR'dan daha yararlı olabilir. PCR ile oluşturulan yeni DNA veya RNA



Şekil 4. SDA. Reaksiyonun ilk yarısında (A) orijinal hedef baz dizisi, her iki uçta bulunan kesilebilir HincII yeri ile hemifosforothioat formuna dönüşür. Bunlar reaksiyonun ikinci kısmına katılır ve transforme hedef sekansının eksponansiyel olarak amplifiye olmasını sağlarlar. Reaksiyonun ilk (A) kısmında örnek DNA, hedef sekansını tanıyan 4 spesifik primer ile birlikte 95°C'de denatüre edilir. 5' ucunda modifiye olmamış HincII tanıma yeri ve 3' ucunda spesifik hedefi bağlama yeri olan iki primer (S1 ve S2) kullanılır. S1 ve S2 DNA iplikçiklerine zıt yönlere bağlanır. Diğer iki primer (B1 ve B2) sadece hedefe bağlanan primerlerdir. Restriksiyon endonükleaz tanıyan sekansları yoktur.



S1 ve S2 primerlarına başaşağı zıt DNA ipliklerine bağlanırlar. B1 ve B2 primerlarının birlikte bağlanması ile reaksiyonun sonunu belirleyen bir ürün ortaya çıkar ve SDA'ya göre örnek DNA'nın restriksiyon enzim klevajı için ihtiyacı ortadan kaldırırlar. Primerların eklenmesinden sonra reaksiyon karışımı 37°C'ye soğutulur ve ekzonükleaz negatif Klenow fragmanı ve HincII ile birlikte dGTP, dCTP, TTP, ve dATPα'lar (dNTP'lar) eklenir. Ekzonükleaz negatif Klenow fragmanının DNA polimeraz aktivitesi ile 4 primer aynı zamanda uzamaya başlar (A). S1 ve S2 primerları, 5' ucunda modifiye olmamış HincII yeri olan modifiye DNA'nın komplementer iplikleri oluşur. B1 ve B2 aynı iplikleri kullanıma hazırlar. S1 ve S2 tarafından kullanılarak yeni sentezlenen iplikleri uzaklaştırırlar. S1 ve S2'nin bağlanma yerlerinin uzamasını başlatan tanımlı uçlar ile yeni DNA iplikleri üretilir. Başlangıçta S2 ile kullanılıp uzaklaştırılan ipliklere S1 ve B1 bağlanırken S2 ve B2 başlangıçta S1 ile kullanılıp uzaklaştırılan ipliklere bağlanır (A). Bu kalıpta ortaya çıkan uzama ve uzaklaştırma reaksiyonları sonunda, her uçta hemifosforothionate HincII yeri ile tanımlanan iki fragman oluşur. Şimdi, hemifosforothionate HincII uçları bulunan orijinal hedef DNA'nın kopyaları oluşur (A, alt kısım). Bu kopyalar, SDA reaksiyonunun ikinci kısmına girer (B). S1 ve S2'de bağlanma ve uzama adımlarından sonra çift iplikli, belirli uzunlukta, her ucunda HincII yeri olan ve kesilmeye yatkın (S1 ve S2'nin uçlarında modifiye olmamış HincII yerleri vardır) iplikler oluşur. Tekrarlanan kesilme, DNA polimerizasyonu ve zincir uzaklaştırılması sikluslarından ve S1 ve S2 ile uzaklaştırılan tek ipliklerin bağlanmasından sonra hedef DNA'da ekspanansiyel amplifikasyon meydana gelir.

moleküllerinin DNA'ya spesifik olup olmadığını tespit etmek için doğrulama ve tanımlama yapılmasını gerektirir. Bunun aksine, LCR sadece tespit amacıyla bilinen baz dizileri kullanılarak uygulanır. Problar birbirine bağlanma sırasında bitişik yerlere hibridize olur (53).

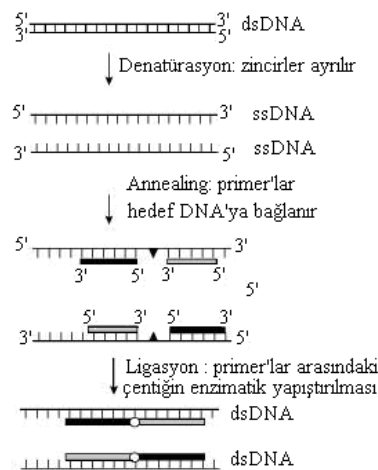
**Avantaj ve dezavantajları:** LCR'nin en önemli avantajları yüksek derecede spesifik olması ve PCR gibi diğer hedef amplifikasyon yöntemleri (Tablo 3) ile birlikte kullanılabilmesidir. Ayrıca, LCR'nin diagnostik laboratuvarlarda kullanılmasını çekici yapan otomatik tespit sistemleri vardır (54). LCR'nin dezavantajları ise; her basamakta DNA ligaz ekleme zorunluluğu, enzimin yüksek ısılarda etkinliğini kaybetmesi, nonspesifik amplifikasyon ürünlerinin oluşabilmesi ve günümüzde henüz kontaminasyon kontrol sistemlerinin olmamasıdır. Termostabil DNA ligaz kullanılarak, hibridizasyon yüksek ısılarda yapılabilmektedir (54)

LCR'nin bir varyasyonu, arık LCR (gapped LCR, gap-LCR) olarak adlandırılır. Bu metotta hem polimeraz hem de ligaz enzimi kullanıldığı için gap-LCR'nin spesifikliği 4 nedenle daha da artmıştır. Birinci olarak; LCR oligonükleotidleri ancak uygun hedef baz dizisi ile hibridize olur, ikinci olarak; DNA polimeraz sadece uygun çiftleşmiş 3' uçlarının uzamasını sağlar, üçüncü olarak; gerekli nükleotid trifosfatlar sağlanırsa DNA polimeraz, birleşen oligonükleotidler arasındaki boşluğu (gap) tamamen doldurmaktadır, ve dördüncü olarak; DNA ligaz, sadece uygun şekilde çiftleşen ve yanyana gelen 3' ve 5' uçlarını birbirine bağlamaktadır. Bu nedenle, LCR, *N. gonorrhoeae* ve *N. meningitidis*'de olduğu gibi birbirine yakın baz dizilimi gösteren mikroorganizmaların ayırt edilmesinde daha tatmin edici sonuçlar vermektedir (53). Son yıllarda, arık

LCR dışında, LDR (Ligase Detection Reaction), pLCR ve RPR (Repair Chain Reaction) adı verilen LCR yöntemine benzer farklı teknikler; geliştirilmiştir (55).

**Uygulamaları:** LCR, klinik örneklerde *N. gonorrhoeae* (56) ve *C. trachomatis*'in (57) tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Kültürle karşılaştırmalı yapılan bir çalışmada 100 ürogenital örnekteki *N. gonorrhoeae*'nin tanımlanması amacıyla 3 prob çifti incelenmiş ve yüksek derecede sensitif (%100) ve spesifik (%98.7) olduğu tespit edilmiştir. Diğer *Neisseriae* türleri veya ürogenital örneklerde sıklıkla rastlanan diğer mikroorganizmalar ile kros reaktivite görülmemiştir (53).

*C. trachomatis*'in tespit edilmesi yönünden PCR ve LCR karşılaştırılmış ve her iki yönteminde 3 elemaner cisimciği tespit için yeterli sensitiflikte



Şekil 5. LCR'daki ilk siklus. Bağlı problemler daha sonraki amplifikasyonlarda kalıp olarak kullanılır. Bu nedenle orijinal hedef DNA amplifiye olur.

**Tablo 3.** İn vitro 3 amplifikasyon yönteminin karşılaştırılması

	PCR	LCR	3SR
Enzim tek etapta eklenebiliyor mu?	Evet	Evet	Evet
Gerekli enzimler	DNA polimeraz	DNA ligaz	RT, RNase H, RNA polimeraz
Spesifikliğin yüksek olması termostabil enzime bağlı mıdır?	Evet	Evet	Hayır
Gerekli olan hedefe spesifik problemlerin sayısı	2	4	2
Termal sikluslar gerekir mi?	Evet	Evet	Hayır
Kontaminasyon kontrol stratejileri mevcut mu?	Evet	Hayır	Hayır
Uzun baz dizileri amplifiye edilebilir mi?	Evet	Hayır	Hayır
Ürünlerin tespit edilmesi kolay mıdır?	Evet	Evet	Hayır
Ürünler klonlanmış veya baz dizimleri belirlenmiş midir?	Evet	Hayır	Evet
Otomatik tespit sistemleri mevcut mudur?	Evet	Evet	Hayır
RNA amplifikasyonu mümkün müdür?	Evet	Hayır	Evet

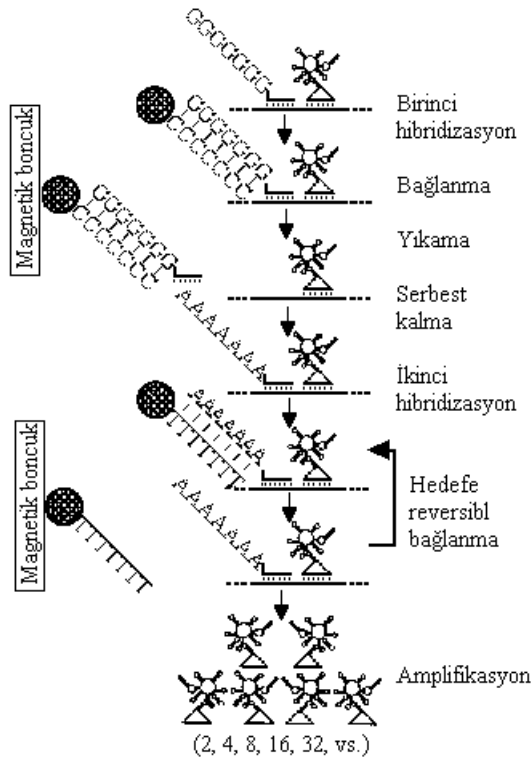
olduğu bildirilmiştir. Hem major dış membran proteinleri hem de plazmidlerden derivate edilen oligonükleotidlerin kullanıldığı bir çalışmada 15 C.

*trachomatis* serovar'ı amplifiye ve tespit edilmiş iken 16 kontaminant mikroorganizma amplifiye olmamıştır. PCR'in aksine, daha fazla spesifiklik elde etmek için LCR'in ilave proba gereksinimi yoktur (57).

LCR, *M. tuberculosis* kompleksine spesifik bir insersiyon sekansından elde edilen floresanla etiketlenmiş oligonükleotitler kullanılarak yapılırsa bu mikroorganizma ile ilgisi olmayan DNA karışımında *M. tuberculosis* kompleksi tespit edilebilmektedir (58).

**2. Q $\beta$  replikaz amplifikasyon yöntemi:** Q $\beta$  replikaz, ilk kez 1988 yılında Prickard ve arkadaşları tarafından tanımlanan bir prob amplifikasyon yöntemidir (59,60). Bu yöntem, Q $\beta$  replikaz enzimi tarafından hedef hibridizasyonundan sonra ekspanansiyel olarak amplifiye olan bir RNA molekülüne, tek iplikçikli oligonükleotid probun katılması temeline dayanır (61,62). Q $\beta$  replikaz, Q $\beta$  bakteriyofajının replikasyonunda görev alan bir RNA bağımlı RNA polimeraz enzimidir. Bu enzim, Q $\beta$  RNA genomunun molekül-içi baz çiftlerinin oluşturduğu özgün sekonder yapıyı tanır.

Q $\beta$  replikaz yönteminde önce hedef DNA'yı tek zincir haline getirmek için 85°C'de denatürasyon yapılır (Şekil 6). Hedef, tek iplikçikli RNA ise bu etaba gerek yoktur. Reaksiyon karışımı soğutulur soğutulmaz, Q $\beta$  replikaz için doğal kalıp görevi yapan midivariyant 1 (MDV-1) raportör probu (63) ve spesifik capture problemler eklenir. Q $\beta$  replikaz enzimi MDV-1 RNA'yı substrat olarak kullanabilmektedir (64). Yakalayıcı problemler, bu işlem sırasında bağlanmayan raportör problemlerin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlar. Reaksiyon karışımı 37°C'de 30 dk inkübe edilerek hibridizasyon gerçekleştirilir. Hibridizasyon şartları reaksiyon spesifikliğini etkiler. Yani hibridizasyon, sadece bir tek baz ile ayrılan hedefler arasında ayırdedilen şartlarda meydana gelir.



**Şekil 6.** Q $\beta$  replikaz dual capture assay. Hedef DNA veya RNA'yı hibridize etmek için hedefe spesifik capture problemler (poli G) ile birlikte bir MDV-1 (Q $\beta$  replikaz substratı) probu kullanılır. MDV-1 probu, capture probunu hedef DNA'ya bağlar. Daha sonra bu komplekse, bir ucuna magnetik boncuk bağlanmış olan capture problemler (poli C) bağlanmaktadır. Boncuklar yıkılarak MDV-1 problemlerinin hedeften ayrılması sağlanır. Bu işleme 3 veya daha fazla devam edilip hedef-MDV-1 prob kompleksleri, Q $\beta$  replikaz içeren amplifikasyon tampon sıvısı içine konur ve üzerine yıkamış hedef-prob kompleksi eklenir. Bu karışım 37°C'de inkübe edilerek prob amplifiye edilir.

Ayrıca, testin spesifikliğini artırmak için raportör ve capture problemlerinin sekansı optimize edilir. Böylece her ikisi de sinyal oluşturmak üzere hibridize olur. Hibridizasyondan sonra, bağlanmayan MDV-1 problemleri yıkılarak uzaklaştırılırken bağlı olan MDV-1 problemleri uzaklaştırılmaz ve arka planda amplifikasyon meydana gelir. Reaksiyon karışımı daha sonra 37°C'ye ısıtılır ve MDV-1 amplifikasyon reaksiyonunu başlatmak için Q $\beta$  replikaz eklenir. 15 dakikadan sonra, EDTA eklenerek amplifikasyon reaksiyonu durdurulur. Amplifiye olan ürünler, bu ürünleri tespit eden yöntemlerden biri kullanılarak ölçülür. Prichard ve Stefano, RNA birikimini ölçmek için nükleik asitlere bağlanan bir floresan boya kullanmışlardır.

Bu yöntemin duyarlı bir test olarak kullanılmasını engelleyen tek problem arka planda amplifikasyon ürünlerinin oluşmasıdır. Arka planda oluşan amplifikasyon ürünleri tespit edilerek net amplifikasyon hesaplanabilir. Hibridizasyonu kontrol etmek için Q $\beta$  substratında RNase III enzimine duyarlı bir bölge eklenir (65). RNase III için çift iplikli RNA substratlar oluşmadığı için prob hedef nükleik aside hibridize olduktan sonra RNase III tarafından tanınmaz. RNA problemleri hedef nükleik asit dizilerine hibridize edildikten sonra ortama eklenen RNase III, tek iplikli RNA moleküllerini parçalayarak, nonspesifik amplifikasyon ürünlerinin oluşmasını engeller. Oysa, hibridize olmuş çift iplikli RNA molekülleri sağlam kalır, ve Q $\beta$  replikaz için substrat görevi görürler. Enzimin otuz dakikalık bir tepkime sonunda, probu yaklaşık 10<sup>9</sup> kez çoğaltabildiği bildirilmektedir (3).

**Avantaj ve dezavantajları:** Q $\beta$  replikaz yönteminin en önemli avantajı çok hızlı olmasıdır (59). 37°C'de her 20 dk'da 200 nükleotid RNA hedef meydana çıkar. Teorik olarak 200 nükleotid RNA hedef 13 dk içinde 10<sup>12</sup> progeni iplik ortaya çıkarır (62). Büyük miktarda oluşan bu ürünler nükleik asit tespit yöntemlerinden herhangi biri ile incelenebilir. Deney 2-3 saat içinde tamamlanabilmektedir. Bir diğer önemli avantajı reaksiyonun izotermal şartlarda gerçekleşebilmesidir. Bu nedenle, 37°C'lik dış ısıyı kontrol eden cihaz dışında spesifik laboratuvar donanımına ihtiyaç duyulmamaktadır. Reaksiyon sonunda büyük miktarda amplifikasyon ürünü oluştuğu için bu prosedür oldukça duyarlı ve tatmin edicidir. Çünkü büyük miktardaki amplifikasyon ürünleri nonradyoaktif yöntemlerle kolayca tespit edilebilmektedir. Q $\beta$  replikaz yönteminin basit ve

muazzam miktarda amplifikasyon ürünü oluşturması dışında otomatize sistemleri de geliştirilmiştir. İlaveten, multipl hedef tespit yöntemleri yapılabilir (59). Farklı MDV-1 raportör problemler, bir deneyde kullanılabilir. Hibridizasyon ve amplifikasyondan sonra, bunlar farklı hedeflerin tanımlanmasını sağlayan spesifik cDNA capture problemlerine göre sıralanabilir.

Q $\beta$  replikaz yönteminin en önemli *dezavantajları*; bağlanmayan ya da nonspesifik olarak bağlanan raportör problemlerin amplifikasyon için kalıp olarak kullanılması ve yanlış pozitifliklere neden olmasıdır. Bu nedenle maksimum duyarlılık elde edebilmek için amplifikasyon sırasında çok titiz davranmak ve bağlanmayan veya nonspesifik bağlanan problemlerin ayrılmasını sağlayan etkili yöntemlerin kullanılması gerekir. Q $\beta$  replikaz yönteminde bağlanmayan MDV-1 problemlerinin başarıyla ayrılmasını sağlayan geri dönüşümlü hedef capture (60,66) veya çift yakalama (dual capture) yöntemleri geliştirilmiştir. Sorunu arka plan gürültü ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşmasıdır. Ancak, yukarıda anlatılan yollarla bu sorun çözülebilir. MDV-1 cDNA dizilerini içeren plazmid ve Q $\beta$  replikaz enziminin ticari olarak satışının olmaması yöntemin yaygın olarak kullanılması engelleyen diğer sorundur. Test tamamen optimize edildiği zaman capture (veya recapture)'ın etkinliği her siklus için yaklaşık %65-75'dir. Arka zeminde oluşan hibridizasyon nedeniyle bu testin ticari versiyonlarının tespit sınırı yaklaşık 600 hedef moleküldür.

Arka plan gürültü problemi çözülebilirse, basitliği ve muazzam amplifikasyon yapabilmesi nedeniyle Q $\beta$  replikaz yöntemi, moleküler diagnostik laboratuvarlar için çekici bir yöntem olacaktır. Q $\beta$  replikaz yöntemi ile *M. tuberculosis* (67), *Plasmodium falciparum*, HIV-1, CMV, *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* (68) dahil çeşitli mikroorganizmaların tanımlayıp tanımlayamayacağı araştırılmaktadır.

**C. Sinyal amplifikasyon yöntemleri:** Son yıllarda geliştirilen çeşitli sinyal amplifikasyon yöntemleri ile prob bazlı testlerin duyarlılığı artırılmıştır (69). Sinyal amplifikasyon yöntemlerinde hedef DNA veya RNA'nın spesifik baz dizilerine bağlanan probun yaydığı sinyaller artırılmaktadır. Bu yöntemlerde, farklı hedeflere karşı kullanılan multipl etiketli problemler veya prob sinyalini artırmak amacıyla multipl enzimlerle birleştirilen primer ve sekonder prob kombinasyonları kullanılır (69). Basit sinyal amplifikasyon yöntemlerinde bir tek hedef proba

bağlanan multipl raportör moleküller kullanılır. Bu durumda, sadece bir raportör molekülü proba göre daha fazla sinyal elde edilebilmektedir. Bu yöntemlerin en önemli *avantajları*; nükleik asid hedefleri veya problemleri amplifiye etmeden mikroorganizmanın tespitine imkan verdiği için kontaminasyon problemi yoktur. Kullanılan problemler enzimle birleştirilmiştir. *Dezavantajları* ise; raportör problemlerin nonspesifik bağlanması sonucu ortaya çıkan arka plan gürültüdür. Bu problem nedeniyle prosedürde modifikasyonlar yapılmış, hedef capture problemler kullanılarak arka plan gürültü azaltılmıştır (66). Bir diğer dezavantajı, duyarlılığının hedef ve prob amplifikasyon yöntemlerine göre daha düşük olmasıdır. Sinyal amplifikasyon yöntemlerinin duyarlılığı  $10^3$ - $10^5$  moleküldür (70).

Bu yöntemde bazı iyileştirmeler yapılmıştır. Bir tek prob üzerinde multipl raportör molekül kullanmak yerine multipl etiketli problemler kullanılır. Etiketli problemler hedef sekansının farklı bölgelerine yönlendirilmiştir. Böylece multipl hibridizasyon sonucu bir probun ürettiğinden daha fazla sinyal üretilir. Daha fazla sinyal üretmek için daha komplike sinyal amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin birinde kullanılan etiketsiz hedefe bağlanan probda hem hedef sekansına komplementer bir bölge hem de daha küçük hedeften bağımsız multipl raportör prob bölgeleri vardır. Bu yöntem bileşik prob ağı oluşturur. Özellikle multipl raportör moleküller raportör problemlere bağlanınca sinyalde anlamlı artma meydana gelir.

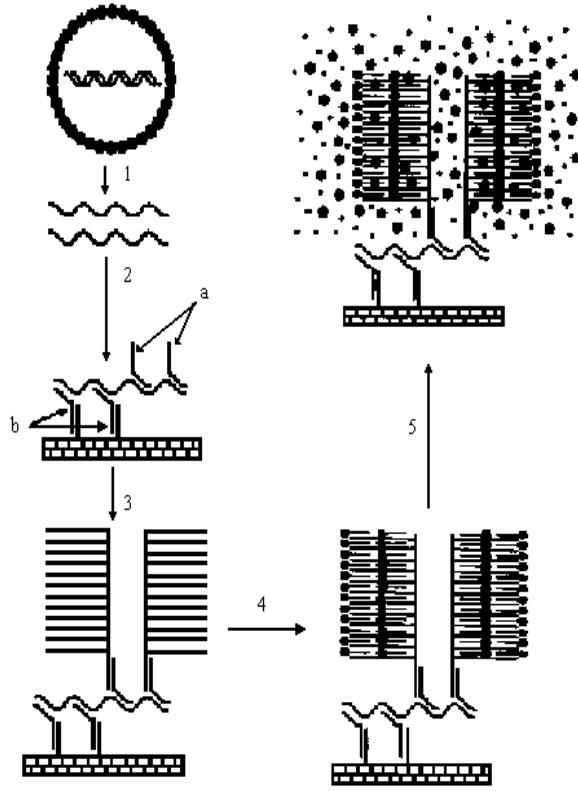
### **Nükleik asid hibridizasyonunun tespitinde kullanılan raportör moleküller**

Geçmişte, genellikle raportör moleküller olarak radyoaktif izotop etiketler ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ve  $^{125}\text{I}$ ) kullanılmaktaydı. Bu raportörler, son etiketleme veya random priming gibi teknikler kullanılarak nükleik asid problemlerine dahil edilebilir (71-73). Hibridizasyon reaksiyonlarını tespit etmek için daha sonra otoradyografi veya beta sayaçları kullanılır. Klinik laboratuvarlarda rutin kullanım için radyoizotop tespit yöntemlerinin bazı dezavantajları vardır; izotopun yarılanma süresine bağımlıdır, radyasyon tehlikesi vardır, kullanıcı tarafından uyulması gereken kuralları ve atık imha problemleri vardır. Son yıllarda birçok nonradyoaktif tespit yöntemleri geliştirilmiştir. Spesifik aktivite, ilk jenerasyon sistemlerde kötü olmasına rağmen diğer jenerasyonlarda daha iyidir.

Nonradyoaktif sistemlerin avantajları; yarılanma ömrü problemlerinin olmaması, özel düzenlemelerin gerekmemesi ve komplike deney koşulları veya atık imha problemlerinin olmamasıdır.

Günümüzde kullanılan nonradyoaktif tespit yöntemlerinde biotin, digoxigenin ve horseradish peroksidaz (HRP) ile etiketleme yapılır. Bu moleküller, enzimatik veya nonenzimatik yöntemlerle direkt olarak nükleik asid problemlere bağlanabilmektedir (74,75). Bu raportör grupları; 1) avidin, genellikle peroksidaz veya alkali fosfataz gibi bir enzime bağlanır ve antidigoxigenin alkali fosfataz konjugat kullanılırsa kromojenik olarak, veya 2) HRP ile katalize olan ışık üretimi ile tespit edilebilir. Günümüzde DNA-RNA problemlerini etiketleme için kullanılan bir çok ticari hazırlanmış kromojenik veya kemiluminesan substratlı kitler bulunmaktadır. En son geliştirilen nonradyoaktif raportör prob etiketleme yöntemi kemiluminesan yöntemidir. Kemiluminesan raportörler, hibridizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra bazı substratlarla ışık salan kimyasal gruplardır (76). Yayılan ışık birkaç yöntemle tespit edilebilir; Otoradyografi, sintilasyon sayacı veya luminometre denen aletlerle ölçülebilmektedir. Kemiluminesan testlerinin duyarlılığı hem  $^{32}\text{P}$  ile etiketli problemler hem de nonradyoaktif raportör yöntemlerinin avantajlarına sahiptir. İn situ hibridizasyonla prob tespiti için, en popüler yöntem, örnek lamı üzerine gümüş emülsiyonu yayılarak otoradyografik tespit yöntemlerinin radyoaktif etiketlerle birleştirilmesidir (77). Hibridizasyon tespitinde kullanılan kromojenik prosedürlerin uygulandığı testler, şimdi ticari olarak mevcuttur (78). Biotin, in situ hibridizasyonda kullanılan nonradyoaktif bir etikettir. Digoxigenin, artan sıklıkta kullanılmaktadır. Konjuge enzim substratla inkübe edildikten sonra hibridizasyon yerinde renkli bir presipitat meydana gelir. Radyoaktif problemler halen sensitivite yönünden altın standart kabul edilmektedir. Çünkü in situ hibridizasyon için her hücrede en az 10 mRNA kopyasını tespit edebilmektedir (79).

Kullanılan prob sayısına göre farklı sinyal amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Hedef dizilere spesifik çok sayıda farklı prob kullanılan sistemlerin duyarlılığı, az sayıda prob kullanılan sistemlere göre daha fazladır. Bu durumda bir hedef proba birden fazla probun bağlanmasıyla probun sinyali artmaktadır. Bu üstünlük, özellikle HIV, HCV gibi mutasyonların sık olduğu viral gen dizilerinin saptanmasında yararlı olmaktadır.



Şekil 7. bDNA sinyal amplifikasyon yöntemi. Mikroorganizma parçalanarak elde edilen hedef nükleik asit denatüre edilir (1). Bu nükleik asitler, katı faza bağlanmış capture problemlerle (a) hibridize edilir (2). Daha sonra komşu hedef sekansla hibridize olan ve dallanmış DNA (amplifikasyon multimerleri) ile hibridize olabilen ekstender problemler (b) eklenir. bDNA'ya (3) enzimle etiketli problemler hibridize edilir (4). Substrat (dioxetane) eklenip ortaya çıkan kemiluminesans ölçülür (5).

**1. Bileşik problemler:** Bileşik problemler iki işlevsel bileşenden oluşur: birincil prob, hedef dizilere özgüdür ve aynı zamanda ikincil problemlerin bağlanabileceği çok sayıda bölge içerir. İkincil problemler ise sinyal oluşturan haberci gruplar (örneğin, biotin) taşır (80). Hedef DNA dizilerine bağlanan birincil problemler ve bu yapılarla bağlanan ikincil problemler bileşik prob ağı oluşturur, ve böylece probun oluşturduğu sinyaller önemli ölçüde çoğaltılmış olur. Yöntemin duyarlılığı  $10^4$  - $10^5$  moleküldür.

**2. Dallanmış DNA (branched DNA, bDNA) prob yöntemi:** Chiron firması tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde en güçlü sinyal amplifikasyon yöntemi kabul edilen bu teknikte (70,73,81) bir çok raportörlerle birlikte multipl prob kullanılır. Bu yöntemde etiketlenmemiş bir hedefe

bağlanan proba hibridizasyondan sonra istenen nükleik asit sekansını izole etmek için spesifik bir hedef yakalayıcı prob kullanılır (Şekil 7). Önce hedef nükleik asit, özgün problemler ile hibridize katı faza bağlanır. Dallanmış DNA probu ile işlemden sonra ortama haberci moleküller (alkalen fosfataz) taşıyan ve dallara üzü diziler taşıyan problemler eklenir. Böylece her bir bDNA probuna yaklaşık 3000 haberci molekül bağlanmış olur. Haberci moleküllerin oluşturduğu sinyaller uygun bir substrat kullanılarak luminometre ile ölçülür. Yöntemin duyarlılığı  $10^3$  - $10^5$  moleküldür.

Burada kullanılan hedef bağlayan problemler, iki hibridizasyon sekansı kapsayan bileşik prob sisteminde kullanılan hedef bağlayan problemlere benzer. Bir bölümü hedef sekansın komplementeri diğeri ise bDNA amplifikasyon multimeri ile hibridleşme kapasitesindedir. Amplifikasyon multimeri, bu yöntemin amplifiye edici gücünü gösterir. Bu multimerler, oligonükleotidlere belirli aralıklarla katılan dallanan nükleozid analoglarından yapılan tarak şeklinde iskelet üzerinde kimyasal olarak sentezlenir. Multimerler, birçok hedeften bağımsız raportör problemlere bağlanır, sinyalde anlamlı artışlara neden olurlar. Bu sistemde kullanılan raportör moleküllerin tipine bağlı olarak, her hedef sekansına 3000'den fazla raportör molekül katılabilir. bDNA prob yöntemi yüksek spesifikliğe sahiptir. Çünkü sinyal amplifikasyonu meydana gelmeden önce hem capture hem de hedef problemler bağlanmaktadır. Bunun aksine, nonspesifik hibridizasyonda aynı non-hedef sekanslara hem capture hem de hedef problemlerin hibridize olması nadiren ortaya çıkar.

bDNA'nın prob yönteminin en önemli *avantajları*; uygulama kolaylığı ve bir testte birkaç farklı capture ve hedef bağlama problemlerinin kullanılabilmesidir. Böylece anlamlı sekans heterogeneitesi olan hepatit C virüsü ve HIV gibi virüslerin hedef nükleik asitleri tespit edilebilmektedir. Sekans farkından dolayı spesifik capture veya hedef problemler hibridize olmazsa, arta kalan prob komplekslerinden dolayı sinyal üretimi tamamen kaybolmaz. Hepatit B ve C virüsleri (82,83), HIV-1 (84) ve CMV (85) için bDNA prob yöntemleri geliştirilmektedir. bDNA prob yöntemi virüsler hakkında kantitatif bilgi de sağladığı için antiviral tedavinin izlenmesinde de kullanılır. Antiviral tedaviye cevabın belirlenmesi ile daha uzun süre tedavi gerekip gerekmediği veya antiviral ajan dozunun artırılıp arttırılmamasına karar verilmektedir.

## SONUÇ

Hedef amplifikasyon yöntemleri, patojen mikroorganizmaların varlığını saptamaları ve gen dizilerine ilişkin bilgi verebilmeleri açısından yararlıdır. Prob amplifikasyon yöntemleri ise özellikle nokta mutasyonların saptanmasında işe yarayabilir. Bu iki yöntemin duyarlılıkları, uygun koşullar altında çok yüksektir. Ancak bu avantajları, aynı zamanda dezavantajları da olmaktadır. Gerekli önlemler alınmazsa çapraz bulaşlara bağlı yalancı pozitiflik sıktır. Sinyal amplifikasyon yöntemlerinde nükleik asit dizilerinin çoğaltılması söz konusu olmadığından çapraz bulaşlara bağlı yalancı pozitiflik çok ender görülür. Ancak, bu yöntemlerin duyarlılığı ilk ikisine göre daha düşüktür. Bu nedenle klinik örnekte patojen sayısı göreceli yüksek olmalıdır.

Diğer bazı amplifikasyon yöntemleri de geliştirilmiştir, ancak ticari kitleri henüz mevcut değildir. Gelecekte bu yöntemlerin rutin tanıdaki rollerinin ne olacağı bilinmemektedir. Nükleik asit sekansına dayalı amplifikasyon (nucleic acid-based amplification, NASBA), Q $\beta$  replikaz amplifikasyonu ve iplikçik uzaklaştırarak amplifikasyon (strand-displacement amplification, SDA) sistemleri ticari kullanıma uygundur ve gelecekte geliştirilmeleri beklenmektedir (6).

## KAYNAKLAR

1. Tompkins LS. The use of molecular methods in infectious diseases. N Engl J Med 1992;327:1290-7.
2. Eisenstein BI. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. J Infect Dis 1990; 161:595-602.
3. Persing DH. In vitro nucleic acid amplification techniques. "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. (ed): Diagnostic Molecular Microbiology". American Society for Microbiology, Washington 1993:51.
4. Goto MS, Oka S, Okuzumi K, et al: Evaluation of acridinium-ester labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol 1991;29:2473-6.
5. Huffnagle KE, Gander RM. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. J Clin Microbiol 1993;31:419-21.
6. Padhye AA, Smith G, McLaughlin D, et al. Comparative evaluation of a chemiluminescent DNA probe and an exoantigen test for rapid identification of *Histoplasma capsulatum*. J Clin Microbiol 1992;30:3108-11.
7. Hosein IK, Kaunitz AM, Craft SJ. Detection of cervical *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with deoxyribonucleic acid probe assays in obstetric patients. Am J Obstet Gynecol 1992;167:588-91.
8. Limberger RJ, Biega R, Evancoe A, et al. Evaluation of culture and the Gen-Probe PACE 2 assay for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens transported to a state health laboratory. J Clin Microbiol 1992;30:1162-6.
9. Blanding J, Hirsch L, Stratton N, et al: Comparison of the clearview chlamydia, the PACE 2 assay and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* from cervical specimens in a low-prevalence population. J Clin Microbiol 1993;31:1622-5.
10. Warren R, Dwyer B, Plackett M, et al: Comparative evaluation of detection assays for *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 1993;31:1663-6.
11. Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1988;1:82-101.
12. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. N Engl J Med 1990;322:178-83.
13. Peter JB. The polymerase chain reaction: Amplifying our options. Rev Infect Dis 1991;13:166-71.
14. Persing DH. Polymerase chain reaction: Trenches to benches. J Clin Microbiol 1991;29:1281-5.
15. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 1991;252:1643-51.
16. Woolford AJ, Dale JW. Simplified procedures for detection of amplified DNA using fluorescent label incorporation and reverse probing. FEMS Microbiol Lett 1992;99:311-6.
17. Nickerson DA, Kaiser R, Lappin S, et al. Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:8923-7.
18. Cimino GD, Metchette KC, Tessman JW, et al: Post-PCR sterilization: A method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res 1991;19:99-107.
19. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. Gene 1990;93:125-8.
20. Reischl U, Kochanowski B. Quantitative PCR. A Survey of the Present Technology. Mol Biotechnol 1995;3: 55-71.
21. Lau JY, Davis GL, Kniffen J, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. Lancet 1993;341: 1501-4.
22. Mulder J, McKinney N, Christopherson C, et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type I RNA in plasma: application to acute retroviral infection. J Clin Microbiol 1994;32 : 292-300.
23. Boivin G, Edelman CK, Pedneault L, et al. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant varicella-zoster virus isolated from patients with AIDS. J Infect Dis 1994;170 : 68-75.
24. Bagnarelli P, Menzo S, Vlenza A, et al. Quantitative molecular monitoring of human immunodeficiency virus type I activity during therapy with specific antiretroviral compounds. J Clin Microbiol 1995;33: 16-23.

25. Louwagie J, McCutchan E, Peeters M, et al. Phylogenetic analysis of gag genus from 70 international HIV-I isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993;7:769-80.
26. Novati R, Thiers V, d'Arminio-Monforte A, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1992;165: 720-3.
27. Pyra H, Böni J, Schüpbach J. Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91 : 1544-8.
28. Heneine W, Yamamoto S, Switzer WM, et al. Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type I. *J Infect Dis* 1995;171: 1210-6.
29. Eisenbach KD, Sifford MD, Cave D, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1160-3.
30. Abbott M, Poiesz B, Byrne S, et al. Enzymatic gene amplification: Qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in-vitro. *J Infect Dis* 1988;158:1158-69.
31. Butcher A, Spadoro J. Using PCR for detection of HIV-1 infection. *Clin Immunol Rev* 1992;12:73-6.
32. Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993;259:1749-53.
33. Young KKY, Resnick RM, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993;31:882-6.
34. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988;158:1185-92.
35. Kuypers JM, Critchlow CW, Gravitt PE, et al. Comparison of dot filter hybridization, Southern transfer hybridization, and polymerase chain reaction for diagnosis of anal human papillomavirus infection. *J Clin Microbiol* 1992;31:1003-6.
36. Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:2847-51.
37. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, et al. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990;323:1573-80.
38. Relman DA, Falkow S. Identification of uncultured microorganisms: Expanding the spectrum of characterized microbial pathogens. *Infect Agents Dis* 1992;1:245-53.
39. Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, et al. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 1992;327:293-301.
40. Kwok DY, Davis GR, Whitfield KM, et al. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1173-7.
41. Froussard P. rPCR: a powerful tool for random amplification of whole RNA sequences. *PCR Meth Applic* 1993; 2: 185.
42. Compton J. Nucleic acid sequence amplification. *Nature* 1991;350: 91.
43. Gingeras TR, Prodanovich P, Latimer T. Use of self sustained sequence replication reaction to analyze and detect mutations in zidovudine-resistant Human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1991;164: 1066.
44. Gingeras TR, Kwok DY. In vitro nucleic acid amplification techniques: issues and benefits. *Praxis Biotechnol* 1992;4: 403.
45. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwok DY, et al. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1874-8.
46. Davis GR, Blumeyer K, DiMichele LJ, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 in AIDS patients using amplification-mediated hybridization analyses: Reproducibility and quantitative limitations. *J Infect Dis* 1990;162:13-20.
47. Bush CE, Donovan RM, Rich Peterson W, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma samples from high-risk pediatric patients using the self-sustained sequence replication reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:281-6.
48. Walker GT, Little MC, Nadeau JG, Shank DD. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 392.
49. Walker GT, Fraiser ML, Schram JL, et al. Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:1691-6.
50. Dey MJ, Down A, Howard D, et al. Strand displacement amplification (SDA) of *M. tuberculosis* DNA from clinical isolates. abstr. U-41, Abstr. 93<sup>rd</sup> Gen. Meet. Am Soc Microbiol 1993. American Society for Microbiology, Washington DC 1993:176.
51. Landegren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase mediated gene detection technique. *Science* 1988;241: 1077.
52. Backman K. Ligase chain reaction: Diagnostic technology for the 1990s and beyond. *Clin Chem* 1992;38:457-8.
53. Wolcott MJ. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:370-86.
54. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using thermostable DNA ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 189.
55. Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, et al. Ligase chain reaction (LCR)-overview and applications *PCR Meth Applic* 1994;3: 51.
56. Birkenmeyer L, Armstrong AS. Preliminary evaluation of the ligase chain reaction for specific detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1992;30:3089-94.
57. Dille BJ, Butzen CC, Birkenmeyer LG. Amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:729-31.
58. Iovannisci DM, Winn-Deen ES. Ligation amplification and fluorescence detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Mol Cell Probes* 1993;7:35-43.
59. Lizardi P, Guerra C, Lomeli H, et al. Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes. *Biotechnology* 1988;6:1197-202.

60. Prichard CG., Stefano JE. Amplified detection of viral nucleic acid at subattomole levels using Q beta replicase. *Ann Biol Chem (Paris)* 1990;48:492-7.
61. Eoyang L, August J. Q beta RNA polymerase from phage Q beta infected E. coli, In Cantoni GL, Davis DR (eds), *Procedures in Nucleic Acid Research*, vol. 2. Harper & Row, Publishers, Inc., New York. 1971; 829-39.
62. Kacian D, Mills D, Kramer F, et al. A replicating RNA molecule suitable for detailed analysis of extracellular evolution and recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:3038-42.
63. Miele EA, Mills DR, Kramer FR. Autocatalytic replication of a recombinant RNA. *J Mol Biol* 1983;171:281-95.
64. Levisohn R, Spiegelman S. The cloning of a self replicating RNA molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;60: 866.
65. Lomell H, Tyagi S, Prichard CG, et al. Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem* 1989;35: 1826.
66. Hunsaker WR, Badri H, Lombardo M, et al. Nucleic acid hybridization assays employing dA-tailed capture probes. II. Advanced multiple capture methods. *Anal Biochem* 1989;181:360-70.
67. Shan JJ, Liu B, Stone W, et al. A novel method for detection of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum, abstr. U-43, Abstr. 93rd Gen Meet. Am Soc Microbiol 1993. American Society for Microbiology, Washington, DC 1993;176.
68. Klinger JD, Pritchard CG. Amplified probe based assays-possibilities and challenges in clinical microbiology. *Clin Microbiol News* 1990;12:189-207.
69. Wiedbrauk DL. Molecular methods for virus detection. *Lab Med* 1992;23:737-42.
70. Urdea MS, Fultz T, Anderson TJ, et al. Branched amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser* 1991;24:197- 200.
71. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132:6-13.
72. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (addendum). *Anal Biochem* 1984;137:266-7.
73. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed, vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989;10.51-10.70.
74. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(Strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 1991;37:625-36.
75. Nevinney-Stickel C, Hinzpeter H, Andreas A, et al. Non-radioactive oligotyping for HLA-DR1- DRw10 using polymerase chain reaction, digoxigenin-labeled oligonucleotides and chemiluminescence detection. *Eur J Immunogenet* 1991;18:323-32.
76. Pollard-Knight D, Read CA, Downes MJ, et al. Nonradioactive nucleic acid detection by enhanced chemiluminescence using probes directly labeled with horseradish peroxidase. *Anal Biochem* 1990;37:84-9.
77. Brahic M, Haase AT. Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:6125-9.
78. Unger ER, Budgeon LR, Myerson D, et al. Viral diagnosis by in situ hybridization: description of a rapid colorimetric method. *Am J Surg Pculwl* 1986;10:1-8.
79. Hankin RC. In situ hybridization: principles and applications. *Lab Med* 1992;23:764-70.
80. Fahrlander PD, Klausner A. Amplifying DNA probe signals: a "Christmas tree" approach. *Bio/Technology* 1988;6: 1165.
81. Sanchez-Pescador R, Stempien MS, Urdea MS: Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1 b-lactamase-mediated penicillin resistance in Neisseria gonorrhoea and other bacteria. *J Clin Microbiol* 1988;26: 1934.
82. Douglas DD, Rakela J, Taswell HF, et al. Correlation of a quantitative HCV RNA, anti-HCV IgM, and Serum ALT with Histopathological Presentation. American Association for the Study of Liver Diseases, Chicago. 1992.
83. Wilber JC, Johnson PJ, Daley PJ, et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in serum or plasma, abstr. S-44, Abstr 92<sup>nd</sup> Gen Meet. Am Soc Microbiol 1992. American Society for Microbiology, Washington DC. 1992:406.
84. Pacht CA, Kern DG, Sheridan PJ, et al. Quantitative detection of HIV RNA in plasma using a signal amplification probe assay, abstr. Program Abstr. 32<sup>nd</sup> Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC 1992:1247.
85. Shen LP, Kolberg JA, Spaete RR, et al. A quantitative method for detection of human cytomegalovirus DNA using a branched DNA enhanced label amplification assay, abstr. Abstr. 92<sup>nd</sup> Gen Meet Am Soc Microbiol 1992. American Society for Microbiology, Washington, DC 1992:S-54, 408.

**Yazışma adresi :** Dr. İ.Halil ÖZEROL  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD  
44069 MALATYA  
Tif: 0 422 3410660/1038  
e-mail : iozerol@aidata.com.tr