



Hastalık Etmeni Patojen Teşhisinde PCR Teknolojisi

Emre SEVİNDİK¹

A. Çağrı KIR²

Kadir BAŞKEMER³

Veysel UZUN³

¹Ardahan Üniversitesi Göle Meslek Yüksekokulu

²Ardahan Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

³Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

*Sorumlu Yazar:

E-posta: ph.d-emre@hotmail.com

Geliş Tarihi: 02 Nisan 2013

Kabul Tarihi: 24 Mayıs 2013

Özet

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), rekombinant DNA teknolojisi ile birlikte gelişen, moleküler biyoloji ve genetik alanında sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ile klonlamaya gerek kalmaksızın hedef DNA'nın çoğaltılması sağlanır. Virüsler, bakteriler, bazı mantar türleri insanda, hayvanlarda ve bitkilerde patojenite oluşturan çok önemli bir gruptur. Enfeksiyon hastalıklarında patojenlerin saptanmasında rutin olarak uygulanan PCR çeşitleri bulunmaktadır. Bunlar Nested-PCR, Real- Time PCR, Multipleks PCR, Kantitatif PCR, Touch Down PCR, Solid Phase PCR, ve Revers Transkripsiyon PCR'dir.

Anahtar Kelimeler: PCR, Patojen, Hastalık

Pathogen Causing Disease of Diagnosis PCR Tecnology

Abstract

Polimerase chain reaction (PCR) with which, the development of recombinant DNA tecnology, a technique commonly used in field of moleculer biology and genetic. Duplication of the target DNA is provided with this technique without the need for cloning. Some fungus species, bacteria, viruses constituent an important group of pathogenicity in human, animals and plants. There are routinely applied types of PCR in the detection of pathogens infections diseases. These Nested- PCR, Real- Time PCR, Multipeks PCR, Quantitative PCR, Touch Down PCR, Solid Phase PCR, and Reverse Transcription.

Key Words: PCR, Patogen, Disease

GİRİŞ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), moleküler biyoloji ve genetik alanında geniş bir kullanıma sahip olan bir yöntemdir(1). Bu enzimatik reaksiyon, ortamda polimeraz enzimi ve sentez için uygun moleküller bulunması halinde, DNA ve RNA dizisinin seçilip tanınması ve amplifikasyonunu sağlayan yöntemdir. Bu yöntem moleküler markırların çalışmaları için alternatif bir yol sağlamaktadır. PCR, bakteri, virüs, mantar, protozoon ve parazit gibi hastalık etmenlerinin teşhisinde kullanılmasının yanı sıra, mikrobiyal çalışmalar, adli tıp ve genetik

hastalıkların tanısında da kullanılmaktadır (2,3). PCR tekniğinin bulunmasından günümüze kadar pek çok yeni metotlar geliştirilmiştir. Çoğaltılması istenilen DNA dizisinin bilindiği durumlarda kullanılan metotlar; Nested-PCR, Real- Time PCR, Multipleks PCR, Kantitatif PCR, Touch Down PCR, Solid Phase PCR, ve Revers Transkripsiyon PCR'dir(4).

Bu derleme makalede, PCR tekniği kullanılarak bitkilerde ve hayvanlarda hastalık etmeni olan patojenlerin tanımlanmasın da ve teşhis edilmesi hakkında bilgi verilmiştir.

PCR METOTLARI

Nested-PCR

PCR tekniğinin spesifikliğini artırmak için geliştirilen yöntemdir. Bu yöntemde, birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonu mevcuttur. Yöntemde istenilen amplifiye dizilerin iç bölgesinin çoğaltılması amacıyla dizayn edilen primerlerin kullanıldığı 2 PCR işlemi uygulanmaktadır. Uygulanan ilk amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılarak uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. İkinci amplifikasyon mekanizmasında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak küçük alanın çoğaltılması sağlanmaktadır(5). Bu yöntem ile günümüzde pek çok protozoon, bakteri, virüs ve birçok hastalık etmeni teşhis edilmektedir(6,7). Yapılan araştırmalarda, tüberküloz etmeni *Mycobacterium tuberculosis* (8,9), Q hummasına neden olan *Coxiella burnetii* (10), Spiroket hastalığına neden olan *Leptospira* cinsine ait bakterilerin (11,12), şark çıbanı etmeni *Leishmania* tanısında (13), mavi dil hastalığı, rastık hastalığı gibi bitki, hayvan ve insanlarda bakteri, virüs ve fungusların neden olduğu pek çok patojen mikroorganizmaların teşhisinde Nested-PCR tekniğinin etkin olduğu gösterilmiştir (14,15).

Real- Time PCR

Real-time PCR, DNA ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son zamanlarda popüler olmuş bir tekniktir(16). Gen anlatımının belirlenmesi, farklılaşma ve patolojik durumların saptanması için çok önemlidir. Medikal araştırmalarda ve moleküler tanı çalışmalarında biyolojik materyalle çalışırken çok sayıda doku örneğine veya hücre miktarına ihtiyaç duyulur. Real-time PCR metodu ile çok az miktardaki biyolojik bir örneğin özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir(17). Real-time PCR, enfeksiyon hastalıklarında patojenlerin belirlenmesinde diziye özgü floresan probalar sayesinde klinik laboratuvarında tercih edilen ve rutin olarak uygulanan bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntem sayesinde çok sayıda mikrobiyal patojen tanımlanmış olup antibiyotiklere karşı dirençli olan türler tespit edilmiştir. Vanamisine dirençli *Enterococcus faecalis*'den *E. faecium*, çok yaygın bir patojenite etkeni olan *Candida*'nın bazı önemli türleri belirlenerek bu enfeksiyon ajanlarına özgü floresan primer ve probalar geliştirilmiş ve tanıda kullanılmaya başlanmıştır(18). Real-time PCR tekniği ile et ve et ürünlerinde *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* gibi pek çok patojen bakterinin tanımlanması için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda real-time PCR'ın hızı, hassasiyeti, spesifitesi ve otomasyona uygun olması gibi avantajlarından dolayı gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde umut verici bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür(19). Bunun yanı sıra bu yöntem ile malaria hastalığına neden olan *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, ve *P. Ovale* türleri teşhis edilmiştir(20).

Multiplex PCR

Bu PCR metodunda kalıp DNA dizisini çoğaltmak amacıyla aynı reaksiyon içerisine birden fazla primer çifti ilave edilerek çoğaltma işlemi yapılmaktadır. Bu metod ağırlıklı olarak virüs ve viroidlerin genlerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır (21-23). Multiplex PCR ile genetik çalışmalar yapılmış ve hastalık etmeni patojen

mikroorganizma teşhis edilmiştir. Araştırmalarda bu yöntem uygulanarak *Salmonella enteritidis*, *Salmonella thphimurium* (24), nosokomiyal patojen olan *Acinetobacter baumannii* teşhisinde(25), intraselüler patojen olan *Listeria monocytogenes* tanımlanmasında kullanılan yöntemdir (26). Bakteremi ve insanlarda ishal hastalığı, *Arcobacter butzleri* ve *Arcobacter cryaerophilus*'un neden olduğu ve bu mikroorganizmaların çiftlik hayvanlarında, sulara ve hayvan kaynaklı gıdalarda tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar ile multiplex PCR ile bu hastalık etmenlerinin tanımlanması ve teşhisi sağlanmıştır(27). Multiplex PCR, *Escherichia coli* (STEC) bakterilerinin tanımlanması için en hassas yöntem olarak kabul edilmektedir. Siga toksin üreten *Escherichia coli* (STEC), insanların mide ve bağırsakların önemli hastalık etmenidir. Yapılan araştırmalar sonucunda insanlardan izole edilen *Escherichia coli* (STEC) bakterilerinin teşhis edilmesinde multiplex PCR (mPCR) yönteminden yararlanmış ve başarı sağlanmıştır(28). İnsanlarda *Escherichia coli* O157:H7 tarafından Shiga benzeri toksinler üretilmektedir. Bunlar hemolitik ciddi vakalara ve üremik sendromlara neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda çevresel etmenler olan su ve topraktan kullanılarak multiplex PCR ile *Escherichia coli* O157:H7 tespit edilmiştir (29).

Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR)

Revers Transkriptaz PCR yöntemi, normal PCR'dan farklı olarak RNA çoğaltımını amaçlayan hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. İlk olarak RNA kalıp olarak kullanılarak tamamlayıcı DNA sentezlenir, sonra DNA-RNA sarmalının ayrılması sağlanır, son olarak da ayrılan DNA dizisi kalıp olarak kullanılarak çift zincirli DNA dizisi çoğaltılması sağlanır (30). Bu yöntem ile *Echinococcus* türlerinin gen ekspresyon çalışmaları ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulması sağlanmıştır(31). Yapılan araştırmalarda insan malarya paraziti olan *Plasmodium falciparum*'un olgun gametositlerini RT-PCR ile inceleyerek bu yöntemin az miktarlardaki gametositlerin tanımlanmasında uygun bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (32,33). Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease (BVD/MD) sığırlara mahsus, identik bir virus (Bovine Viral Diarrhea Virus; BVDV) tarafından meydana getirilen, klinikman birbirinden farklı iki formu bulunan hastalıktır. Reverse Transkriptaz PCR yöntemi kullanılarak bovine viral diarrhea virüsü (BVDV) sebep olduğu mukoza hastalığının teşhis edilmesi araştırmalar ile sağlanmıştır (34). *Avian pneumovirus* (APV) hindilerde üst solunum yolu problemleri ile ortaya çıkan hindi rinotrakeitis (turkey rinotracheitis, TRT) hastalığının etkenidir. Virus tavuklarda da görülmekte olup "Şişkin Baş Sendromu" (swollen head syndrome, SHS) olarak bilinen hastalık tablosunu meydana getirmektedir. Reverse Transkriptaz PCR yöntemi kullanılarak *Avian pneumovirus* (APV) enfeksiyonunun varlığının belirlenmesi sağlanmıştır(35).

Touch Down PCR

Touch Down PCR tekniği ile istenmeyen DNA dizilerinin çoğaltımı sağlanmaktadır. İlk aşamada primer sıcaklığı çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziye bağlanması amaçlanmaktadır. Daha sonra turlar ilerledikçe bu sıcaklığın Tm seviyesine düşürülmesine dayanmaktadır (5). *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*, AİDS ve bağışıklık sistemi düşük olan

hastalarda ölüme neden olan fırsatçı bir fungustur. Bu hastalık etmeni Touch down (TD-PCR) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (36). İnsanlarda hastalık etmeni bakteri olan *Chlamydia*'nın 3 türü *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* ve *C. psittaci* zatüreye, trahoma ve solunum yolu enfeksiyonu gibi hastalıklara neden olmaktadır. Erişkinlerde zatüreye hem *C. pneumoniae* hemde *C. psittaci* neden olurken, yeni doğan çocuklarda *C. trachomatis* neden olmaktadır. Touch down PCR yöntemi ile *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* ve *C. psittaci*'nin 16S ve 16S-23S rRNA gen bölgelerinin sekansı yapılmış ve hastalık etmeni olan bu bakteriler teşhis edilmiştir (37). *Aspergillus fumigatus* ipliksi bir mantar olup, fırsatçı patojendir. Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda önemli büyük problemler ortaya çıkarmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda, Touch down PCR ve RAPD analizlerinin birlikte yapılması ile bu fırsatçı patojenin tanımlanmasında kullanılmıştır (38).

Solid Phase PCR (Katı Fazlı PCR)

Solid Phase PCR DNA çip teknolojisinin kullanıldığı, tek nükleotid polimorfizm ve DNA dizi analizlerinde kullanılan yüzeye sabitlenmiş DNA'nın üretiminde kullanılacak bir polimeraz zincir reaksiyon çeşididir. Çoğaltma işlemi yüzeye 5' ucundan tutturulmuş primerler tarafından gerçekleştirilir (5). Bu yöntem, su yada havadaki herhangi bakteri veya virüs tespitini sağlayabilmektedir (39). Klinik örneklerden bakterilerin hızlı bir şekilde tespit edilmesi hasta için antimikrobiyal terapi için önemli bir unsurdur. DNA çip teknolojisi kullanılarak patojen bakterilerin teşhis edilmesi araştırmalar sonucu kanıtlanmıştır (40). Geleneksel olarak havada bulunan bakteriler sınırlı kültür temelli yöntemler ile izlenilmesi sağlanmaktadır. Ancak bir çok bakteri hücreleri aerosol stres örnek koşullarından dolayı kültür edilemeyebilmektedir. PCR, kültür gereksinimi ortadan kaldırmak için hedef nükleik asit sekanslarının tespiti için ve amplifikasyonuna imkan vermektedir. Solid PCR (SP-PCR) ile yapılan çalışmalarda havadaki mikroorganizmaların tespit edilmesinde kullanıldığı ve havada bulunan mantar sporlarının tespitinde kullanılacağı belirtilmiştir (41).

Asimetrik PCR

Asimetrik PCR, DNA dizi analizi ve hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı durumlar için DNA'nın çift sarmalından sadece birinin çoğaltılmasına olanak sağlayan bir polimeraz zincir reaksiyon türüdür. Reaksiyonda kullanılacak olan primerlerden birinin miktarı yüksek tutulup çoğunlukla o primerin bağlanacağı bölgenin çoğaltımı sağlanır. Bunun yanı sıra genel çoğaltma prensibi klasik polimeraz zincir reaksiyonunun aynısıdır (5). Asimetrik PCR yöntemi ile moleküler işaretleme probu kullanılarak adenovirüslerdeki hedef genlerin tespiti (42), *E.coli* kültür ürünlerinin belirlenmesi (43), bitki virüslerinin teşhisinde kullanılmaktadır (44). *Phytophthora infestans*, patates üretimini sınırlayan hastalık etmeni olan bir fungustur. Bu fungus tarımda pek çok sorun oluşturmaya rağmen, genetiği hakkında pek fazla bir şey bilinmemektedir. Zamanla geliştirilen genetik markırlar ve Asimetrik PCR protokolleri sayesinde *Phytophthora infestans* ve diğer *Phytophthora* türleri belirlenmiş ve patates üretimi için yarar sağlamıştır (45).

Kantitatif PCR

Kantitatif PCR, normal PCR da olduğu gibi DNA amplifikasyonunun gerçekleştirildiği, fakat eş zamanlı olarak başlangıç DNA miktarının da hesaplanabildiği bir

polimeraz zincir reaksiyon çeşididir. DNA amplifikasyonunu gerçek zamanlı olarak artan floresan ölçümleri ile ilişkilendirip kantitatif bir sonuç verebilen bir yöntemdir. Bu yöntem bulaşıcı hastalık teşhisinde, bakteri, fungus, kanser çalışmalarında ve genin ifadesinde kullanılmaktadır (5). Toprakta çeşitli miktarda bakteri ve fungus bulunmaktadır. Yüksek miktarda fungus ve bakteriyel organizmaların çeşitliliği toprakta mikrobiyal karakterizasyonu ve miktarını etkilemektedir. Kantitatif PCR (qPCR) yöntemi ile son yıllarda toprakta bulunan bol miktarda fungus ve bakteri gruplarının teşhisini sağlamıştır (46). Bifidobakteriler, normal bağırsak florasının uygun dengede olması için önemli bir rolü sahip oldukları varsayılmaktadır. Araştırmalar sonucunda bağırsak bölgesinde bifidobakterilerin yüksek sayıya ulaşmasıyla dış kaynaklı patojenlerin üremesine engel olduğu bildirilmiştir(47,48). İnsan bağırsak mikrobiyotasında bulunan bifidobakterilerin belirlenmesinde Kantitatif PCR (qPCR) yöntemi yarar sağlamıştır (49).

Sonuç olarak, bu derlemede hastalık etmeni patojenlerin tespiti ve tanımlanmasında etkili olan PCR çeşitleri hakkında bilgi verilmiş, ve PCR çeşitlerinin gelecekte daha çok hastalık tanısında kullanılacağı ve daha güvenilir sonuçlar verilebileceği tahmin edilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Edell, V., Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview, 1-20, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 1998, 357 pages.
- [2] Türkyılmaz S, Esenal MÖ, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları: Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2002. 8(1): 71-76.
- [3] Nagaraja GM, Nagaraju J., Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. Electrophoresis, 1995, 16: 1633-1638.
- [4] Sevindik E., Abacı T.Z., Nested PCR and Applications Area Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2013. 6 (2): 22-26.
- [5] Karataş M. Moleküler Biyoloji Nobel Akademik Yayıncılık. 2012, p. 288-290.
- [6] World Health Organization: Treatment of Tuberculosis. Guidelines for National Programmes. Geneva, 1997.
- [7] Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H., Türkiye'de tüberkülozun kontrolü için kılavuz. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı Ankara. 1999.
- [8] Shukla I, Varshney S, Sarfraz, Malik A, Ahmad Z., Evaluation of nested PCR targeting IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* for the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. Biology and Medicine, 3 (2) Special Issue: 2011,171-175.
- [9] Tzoanopoulos D, Stakos D, Hatseras D, Ritis K, Kartalis G., Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in pericardial fluid, bone marrow and peripheral blood in a patient with pericardial tuberculosis. A case report Neth J Med. 2001, 59:177-80.
- [10] Ogawa M, Setiyono A, Sato K, Cai Y, Shiga S, and Kishimoto T., Evaluation of PCR and nested PCR assays currently used for detection of *Coxiella burnetii* in Japan. Southeast Asian J Trop Med Public Health , 2004, 35:852-855.
- [11] Morshed MG, Konishi H, Terada Y, Aritsuo Y, Nakazawa T., Seroprevalence of leptospirosis in rural flood prone district of Bangladesh. Epidemiol. Infect., 1994, 112:527-531.

- [12] Nassi F, Seixas KF, Jouglard DDS, Simionatto S, Silva FE, Seyffert N, Brod SC Dellagostin AO. Leptospirosis diagnosis using nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2003, 34 (Suppl.1):90-92.
- [13] Maraghi S, Samarraf Zadeh A, Sarlak AA, Ghasemian M, Vazirianzadeh B., Identification of Cutaneous Leishmaniasis Agents by Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR) in Shush City, Khuzestan Province, Iran *Iranian J Parasitol*: 2007, Vol.2, No.3, p.13-15.
- [14] Chauhan HC, Kher HN, Chandel BS, Dadawala AI, Jain L, Agrawal SM and Bhadaniya A., Evaluation of Group specific Nested PCR for detection of Bluetongue virus *Veterinary World*, 2009, 2(5): 179-182.
- [15] Shen W, Xi P, Li M, Sun L, Zhang L and Jiang Z., Development of a sensitive nested-polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Ustilago scitaminea*. *African Journal of Biotechnology*. 2012, 11(46):10541-10547.
- [16] Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends Mol. Med.*, 8: 257-260.
- [17] Bustin SA, Mueller R., Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and potential use in clinical diagnosis. *Clin. Science* 2005, 109, 365-379.
- [18] Günel T., Aydınlı K., Real-Time PCR and Applications *Area Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2009, 2(2): 43-45.
- [19] Törnük F., Kesmen Z., Yetim H., Et ve Et Ürünlerinde Patojen Bakterilerin Teşhisinde Real-Time PCR Tekniğinin Kullanılması *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- [20] Perandin F., Manca N., Calderaro A., Piccolo G., Galati L., Ricci L., Medici C.M., Arcangeletti C.M., Snounou G., Dettori G., Chezzi C., Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis *Journal of clinical microbiology*, vol. 42. Mar. 2004, p. 1214-1219.
- [21] Levy, L., A. Hadidi and S.M. Garsey., Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, . 1992, 2:800.
- [22] Colinet, D., J. Kummert, P. Lepoivre and J. Semal., Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweetpotato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology*, 1994, 84:65-69.
- [23] Minafra, A., A. Hadidi and P. Sandarelli., Sensitive immunocapture and multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of grapevine leafroll associated virus III and grapevine virus B, 11th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), (Abstr.), 1993 137.
- [24] Soumet C., Ermel G., Rose V., Rose N., Drouin P., Salvat G., Colin P., Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella thphimurium* strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology* 1999, 29, 1-6.
- [25] Turton F.J., Gabriel N. S., Valderrey C., Kaufmann E. M. and Pitt L. T. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii* *Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2007. 13, 807-815.
- [26] Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Paul M., Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, Aug. 2004, p. 3819-3822.
- [27] Houf K., Tutenel A., Zutter D.Z., Hoof V.J., Vandamme P., Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters* 193 (2000) 89-94.
- [28] Osek J., Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 1217-1225.
- [29] Campbell R.G., Prosser J., Glover A., Killham K., Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 91, 1004-1010.
- [30] Santagati S, Garnier M, Carlo P, et al. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods, *Br Res Prot* 1997; 217.
- [31] Konrad C, Kroner A, Spiliotis M, Zavala-Gongora R, Brehm K, Identification and molecular characterization of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int Jour For Parasitology*, 2003, 33: 301-12.
- [32] Babiker HA, Abdel-Wahab A, Ahmed S, Suleiman S, Ranford-Cartwright L, Carter R, Walliker D, Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*, 1999, 99: 143-148.
- [33] Bişkin Z., Yıldırım A., İnci A., Düzlü Ö., Parazitolojide Teşhis Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler. *J. Fac Vet Med Univ Erciyes* 2011 8(1) 43-51,
- [34] İssi M., Gülaçtı İ., Kızıl Ö., Karapınar T., Bulut H., Gül Y., Kliniğimizde Gözlemlenen Reverse Transkriptaz – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Doğrulan Mukoza Hastalığı Olguları *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 2006, 20(3), 253-258.
- [35] İça T., Hindi ve tavuklarda avian pneumovirus enfeksiyonlarının indirek floresan antikor testi ve reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu ile teşhisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2005, 52, 179-184,
- [36] Larsen H.H., Masur H., Kovacs A.J., Gill J.V., Silcott A.V., Kogulan P., Maenza J., Smith M., Lucey R.D., Fisher H.S., Development and Evaluation of a Quantitative, Touch-Down, Real-Time PCR Assay for Diagnosing *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, Feb. 2002, p. 490-494.
- [37] Madico G., Quinn C.T., Boman J., Gaydos A.C., Touchdown Enzyme Time Release-PCR for Detection and Identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* Using the 16S and 16S-23S Spacer rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2000, p. 1085-1093.
- [38] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572378?dopt=Abstract> (19.05.2013)
- [39] Toranzos A.G., Alvarez J.A., Solid-phase polymerase chain reaction: applications for direct detection of enteric pathogens in waters. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38(5): 365-369, 10.1139/m92-062.
- [40] Mitterer G., Huber M., Leidinger E., Krisits C., Lubitz W., Mueller W.M., Schmidt M.W., Microarray-Based Identification of Bacteria in Clinical Samples by

Solid-Phase PCR Amplification of 23S Ribosomal DNA Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2004, p. 1048–1057

[41] Alvarez J.A., Buttner P.M., Toranzos A.G., Dvorsky A.E., Toro A., Heikes B.T., Mertlkaš-Pífer E.L., Stetzenbach D.L., Use of Solid-Phase PCR for Enhanced Detection of Airborne Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 1994, p. 374-376.

[42] Poddar S.K., Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus. *Molecular and Cellular Probes*. Volume 14, Issue 1, February 2000, Pages 25–32.

[43] <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/an/b815307h/unauth> (20.05.2013)

[44] Nolasco G., Sequeria Z., Soare C., Mansinho A., Bailey M.A., Niblett L.C., Asymmetric PCR ELISA: Increased Sensitivity and Reduced Costs for the Detection of Plant Viruses. *European Journal of Plant Pathology* May 2002, Volume 108, Issue 4, pp 293-298.

[45] Scott L.D., Clark W.C., Fyffe E.A., Walker D.M., Deah L.K., The differentiation of *Phytophthora* species that are pathogenic on potatoes by an asymmetric PCR combined with single-strand conformation polymorphism analysis. *Letters in Applied Microbiology* 1998, 27, 39–44.

[46] Fierer N., Jackson A.J., Vilgalys R., Jackson B.R., Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, July 2005, p. 4117–4120.

[47] Castellani, A. ve Chalmers, A.J. Manual of tropical medicine, 3rd ed., *William Wood and Co.*, New York, (1919). 276-297.

[48] De Vries, W., Gerbrandy, S.J. ve Stouthamer, A.H. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochimica et Biophysica Acta* (1967). 136, 415-425.

[49] Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Kado Y., Takada T., Matsumoto K., Tanaka R., Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 2004, p. 167–173.