

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Yıllardan beri, biyoloji ve genetik alanındaki gelişmelerle, medikal alanlardaki gelişmeler birbirleriyle etkileşim halinde olmuşlardır. Zaman içinde ortaya çıkan hastalıklar ve sağlık problemleri, araştırmacıları yeni tanı ve tedavi yöntemlerini araştırmaya itmiştir. Bu bulunan yeni yöntemler, daha sonra başka problemler için de kullanılabilir şekilde modifiye edilmişlerdir.

Önceden sadece kendi alanında sınırlı olan ve daha çok biyolojik araştırmalarda kullanılan moleküler genetik alanında son yıllardaki gelişmeler de medikal araştırmacılar üzerinde etkili olmuştur. "

### PCR Nedir?

PCR, spesifik DNA sekansını amplifiye eden yeni bir tekniktir.<sup>1,2</sup> Erlich, Mullis ve arkadaşları tarafından 1985 yılında geliştirilmiştir. Özelliği az bir zaman gereken tam otomatik uygulamada, küçük bir DNA sekansının bir milyon sarmaldan çok spesifik DNA sekanslarına genişletilebilme imkanınıdır. Üstelik çok küçük miktarlardaki DNA sekanslarını amplifiye edebilme yeteneği nedeniyle; Ağız çalkantı sıvısındaki bıkkal hücrelerden, insan saçından, tek bir lenfoid hücreden, kadavradan ve ya sperm hücrelerinden DNA'nın analiz edilebildiği güçlü ve çok duyarlı bir metodudur.

PCR tekniği, moleküler biyolojideki hızlı gelişimin ve teknolojik yeniliklerin bir sonucudur. Son yıllarda immunoblot, cDNA klonlama ve hibridizasyon gibi tekniklerin gelişmesine en son olarak da PCR eklenmiştir.<sup>1,2</sup>

Teknik immünoloji, mikrobiyoloji, genetik, hematoloji ve adli tıp alanlarında geniş kullanım imkanı bulmuştur.<sup>1,2</sup>

nj.O.T.F. Enfeksiyon II. Kliniği, BURSA

### PCR'nun Prensipleri Ve Uygulaması

PCR, üç basit reaksiyonun tekrarlama döneminde oluşmuştur. Bu dönemlerdeki enküasyon ısıları farklı olduğundan reaksiyon küçük tüplerde ısı sabit kitlelerle oluşturulur. Tekrarlama dönemleri ise otomatize edilmiştir.

### Reaksiyonda Kullanılan Kitler

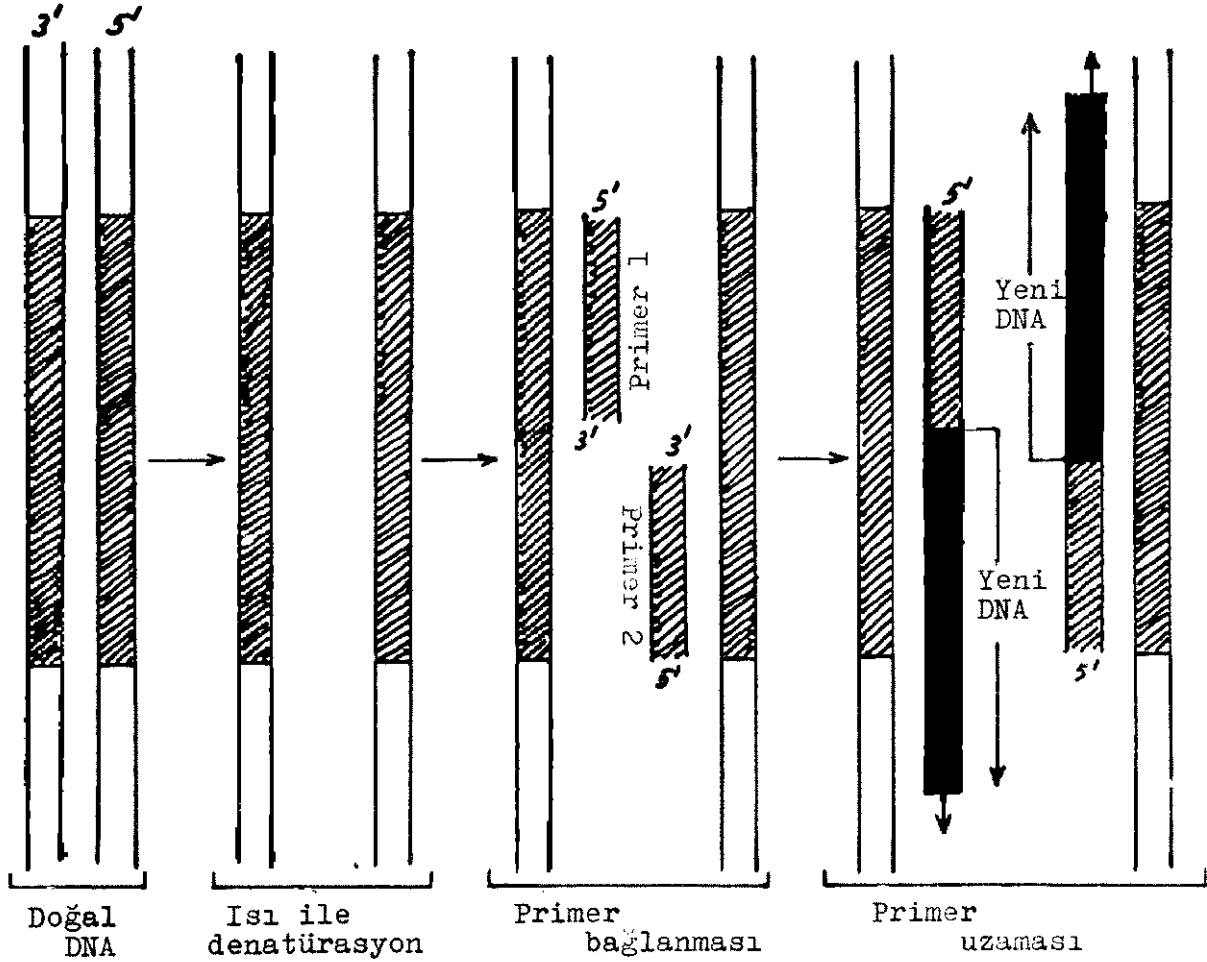
(1) **Primerler:** Hedef DNA'nın bilinen sekanslarına komplementer olarak önceden sentezlenmiş olan spesifik oligonükleotid zincirleridir.

(2) **Deoksiribonükleozid Trifosfat Molekülleri:** Dört farklı dTP molekülleri kullanılır. Bunlar dATP, dGTP, dCTP, ve dTTP'dir.

(3) **Taq DNA Polimeraz:** Erlich ve Mullis PCR'nu ilk uyguladıklarında her siklusta E.coli DNA polimeraz I'in Klenow fragmanını kullanmışlardır. Bu enzim termolabil olduğu için her siklusta reaksiyon karışımına bu enzimin eklenmesini gerekli kılmıştır. Bu durum uygulamanın hızını azalttığı gibi otomasyonunu da güçleştirmiştir.

Daha sonraları Thermus aquaticus adı verilen bir termofilik bakteri türünden elde edilen Taq polimeraz kullanıma sokulmuştur. Bu enzimin özelliği termostabil olmasıdır. Bu durum, enzimin her siklusta eklenme gereğini ortadan kaldırmış ve aynı zamanda testin otomasyonunu kolaylaştırmış ve hızını arttırmıştır. Yine, Taq polimeraz enzimi, önceden kullanılan termolabil enzimlere oranlar daha uzun DNA fragmanlarının amplifikasyonuna izin vermektedir. Termolabil enzimle yaklaşık 20 siklusta ürünlerin birikiminde bir plato mevcutken, Taq polimeraz çok daha fazla siklularda bu platoya sebep olur.<sup>1,2,3,4</sup>

PCR üç adımda gerçekleşir: \*<sup>1,2,3</sup>



Şekil 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonun'un ilk sikhısı. (2)

(1) Muayene materyalinden işleme alınan çift iplikçikli DNA'nın denatürasyonu,

(2) Primerlerin hedef DNA'ya bağlanması (Tavlama),

(3) Primerlerin uzaması.

İlk adımda; Materyalden işleme alınan çift iplikli DNA yüksek ısı (95-100°C) ile denatüre edilir. Yani, Hedef DNA ipliklerini birlikte tutan hidrojen bağları kırılır ve erir. Sonuçta; kendisine karşı cDNA oluşturacak iki ayrı tek DNA iplikçığı oluşur.

Azaltılmış ısılarda gerçekleştirilen ikinci adımda iki kısa DNA primeri hedef DNA'nın karşıt ipliğindeki komplementer sekanslara bağlanır.

Üçüncü adımda; ortama katılan büyük miktardaki deoksiribonükleozid trifosfatlar, yine ortama katılan Taq polimerazla primerler, yeni bir DNA çift zincir formuna uzarlar (Şekil 1).

Sonra primerlerin uzama dönemleri tekrarlanır. İlk önce ısı artırılarak tüm çift iplikçikli DNA'lar tek iplikçikli DNA'lara dönüştürülürler, daha sonra ısı azaltılarak bağlanma (tavlanma) ve uzama dönemlerine izin verilir. Reaksiyon ilerleme adımlarında, genelde 30 döneme kadar gider. Primerler ve deoksiribonükleozid trifosfat molekülleri progresif olarak tüketilir ve yeni DNA ipliklerinin sayısı  $\leftarrow \uparrow$  artar.

Bu reaksiyonda primerler tüm yeni DNA ipliklerinin esasını oluşturdukları için; deoksiribonükleozid trifosfatların yanısıra iki farklı primerin herbiri, başlangıçta hedef DNA'nın miktarına oranla fazla miktarda verilmelidir<sup>(1)</sup>

PCR'nun esas özelliği, önceden sentezlenen yapıların herbirinin, birbirini takip eden dönemlerde yeni primer uzama reaksiyonlarında rol oynamasın-

dandır. Yani, zincir reaksiyonu denilen bu reaksiyon, yeni DNA yapılarının geometrik olarak büyümesidir<sup>(1,2)</sup> (Şekil 2).

Metodun başarı sırrı kısa ürünlerin miktarlarındaki geometrik artmadır. Bu kısa ürünler; DNA'nın çift ipliklerdir<sup>(3)</sup> (Şekil 3).

Son yıllarda RNA viruslarının tespitinde de PCR modifiye edilerek kullanılmıştır. Burada reverse transkriptaz ile Taq polimeraz birlikte kullanılmıştır. Elde edilen komplementer DNA (cDNA) amplifiye edilmiştir<sup>(4)</sup>

### Amplifiye Edilmiş DNA'nın Saptanması

PCR ile amplifiye edilmiş olan DNA'nın en sık tespit edilme metodu Southern blotting'dir. Bu metodda, DNA örneği agar jelde elektroforetik olarak ayrılır ve nitrosellüloz bir kağıt üzerine kapiller etki ile aktarılır. DNA, ısı veya u.v. ışık uygulanarak nitrosellüloza bağlanır. Sonra bilinen radyoaktif DNA problemleri ile hibridize edilir. Daha sonra da otoradyografi uygulanarak cDNA'nın pozisyonu saptanır. Standart nükleik asitler paralelde hareket eder ki böylece DNA bantlarının büyüklüğü ve uzunluğu saptanabilir<sup>(7)</sup>

Son zamanlarda PCR ürünlerini saptamada yeni kolorimetrik bir test de tanımlanmıştır<sup>(8)</sup>

### PCR'nda Karşılaşılan Problemler

PCR, konvensiyonel tanı yöntemlerine, hızlı ve ileri derecede duyarlı bir alternatif olarak umut verici gözükmekteyse de rutin kullanıma geçilmeden önce çözüme kavuşturulması gereken önemli sorunlar vardır.<sup>(9)</sup>

PCR uygulamalarının son yıllarda çok artmış olması, bir çok araştırmacıda bu testin tasarımının ve yürütülmesinin yeterli bir dikkatle uygulanıp uygulanmadığı endişesini uyandırmıştır. Testin çok fazla duyarlı olması yararları yanında bazı büyük problemleri de gündeme getirmiştir.<sup>(1,2,3,4,5,6,7,8,9)</sup>

PCR uygulamasının en büyük problemi, önceden amplifiye edilmiş DNA'nın aktarılmasında doğru pozitif örneklerle geçirilen kontaminasyondan kaynaklanan yalancı pozitif reaksiyonlardır. Buna HIV araştırmalarında rastlanan durum örnek verilebilir. Önceden test edilen doğru örneklerden HIV DNA'sının PCR ile amplifikasyon daha önceden aynı laboratuvarlarda yapıldığı için daha sonraki testlerde HIV DNA'sı ile kontaminasyonlar ve yalancı pozitiflikler görülmüştür.<sup>(10)</sup>

Kontaminasyon ve yalancı pozitiflik durumunun önlenmesi için bir çok önlemler önerilmiştir. Bunlar<sup>(2)</sup>

(1) PCR preparasyonlarının fiziksel olarak ayrılmış bölümlerde yapılması.

Önceden amplifiye edilmiş DNA sekansının aktarılmasını önlemek için, ayrı odalarda ya da biosafety hood adı verilen u.v. germisid lambaları bulunan özel bölmelerde örneklerin prepare edilmesi önerilmektedir.

(2) Solüsyonların ve kutlanılan bazı malzemelerin otoklavda steril edilmesi.

Deiyonize su ve tampon solüsyonları rutin olarak otoklavda steril edilmelidir. Yine tek kullanımlık pipet uçları ve mikrosantrifüj tüpleri otoklavda steril edildikten sonra atılmalıdır.

Primerler, dTP molekülleri ve Taq DNA polimeraz kesinlikle otoklavda steril edilmemelidir.

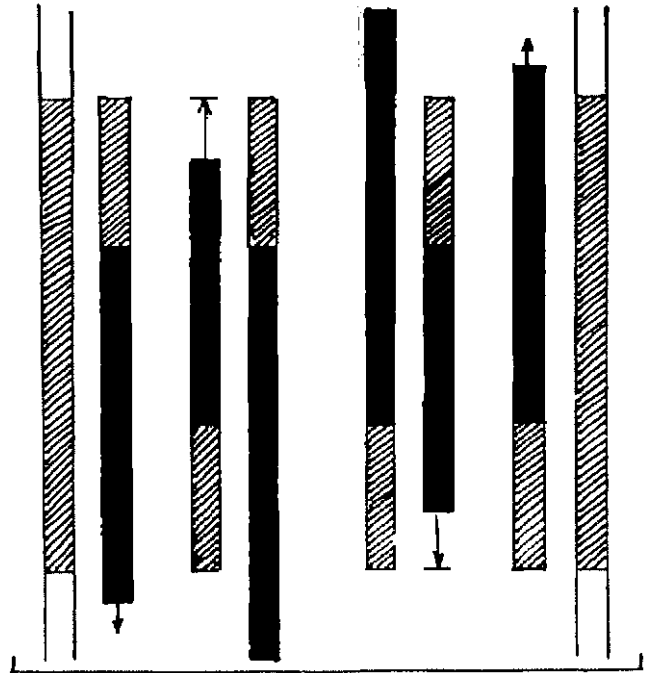
(3) Tek kullanımlık eldivenler kullanılması

Araştırmacılar eldiven giymeli ve izolasyon bölümüne her giriş çıkışta eldivenlerini değiştirmelidirler. Eldivenlerin değiştirilmesi, izolasyon bölgesi dışından ve örnekler arasından amplifiye olabilen DNA'nın transferi olasılığını düşürür.

(4) Tek kullanımlık pipet uçlarının kullanılması.

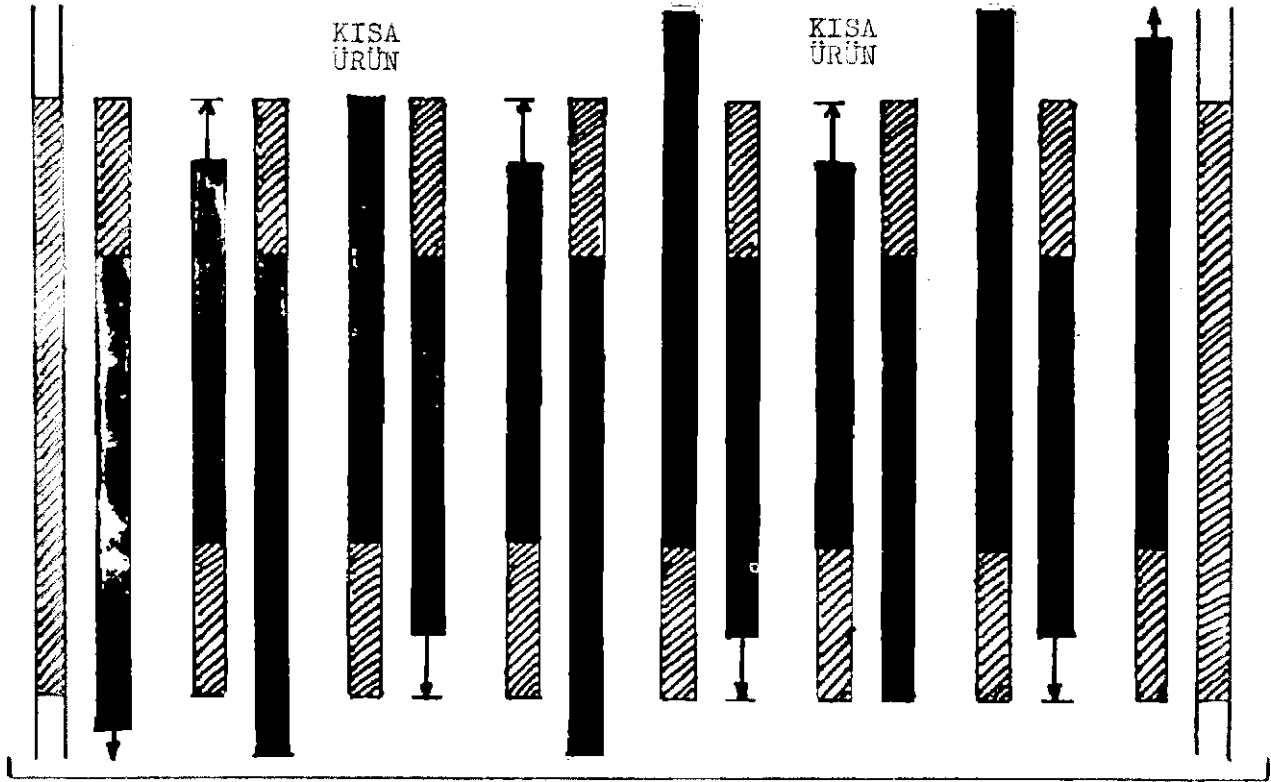
(5) Sıçramaların önlenmesi.

Bazı tüp kapaklarının zor açılması ve bu nedenle zorlama ile açıldığında tüp dibindeki sıvının dışarı sıçraması nedeniyle, kolay açılabilen tüplerin kullanılması önerilmektedir. Ayrıca, eldivenler çıkarılır-



Siklus 2

Şekil 2. Polimeraz zincir reaksiyonu'nun 2. siklusunu. (2)



Siklus 3

v kıl İ. /m. II it .J.KM W'iiii iiiii 3. sıklısı ve kısa ürünlcrin onaya çıkması. (2)

keti meydana gelebilecek sıçramalara da dikkat edilmelidir.

(6) Kullanılan kitlerin ihtiyaca göre belli miktarlarda bölünerek saklanması.

(7) Kullanılacak olan karışımların her seferinde tek tek hazırlanması yerine önceden büyük miktarlarda karışım hazırlanarak çeşitli miktarlarda bölünmesi.

(8) Test örneklerinin yanında zaman zaman negatif kontrollerin devreye sokularak kontaminasyonu olup olmadığının araştırılması.

Fakat yine de bu önerilerin tümü uygulansa bile, kontaminasyon sorunu, tam anlamıyla çözümlenemeyebilir. Hatta, PCR testinin, ayıraçlarının üretildiği binadan uzak bir binada yapılması bile gerekebilir. Bu durum bir kaç laboratuvarın sağlayabileceği bir lüktür."

PCR'nda bir diğer zorluk, pozitif bir sonucun önemini belirlemededir. Sağlıktaki ve hastalıktaki DNA düzeyleri arasında ayırım yapılamamıştır. Bir çok akut viral hastalık için bu bir sorun olmasa da, aynı şey kronik hastalık için geçerli değildir. Papillo-

ma virus tip 16 iyi bir örnek oluşturmaktadır: PCR testi, normal servikal sitolojisi olan kadınların %80'inden fazlasının serviksinde ve servikal kanserli kadınların bütün biyopsi örneklerinde bunun bulunduğu göstermiştir. Buradaki ikilem, yakın zamanda içlerinden birinin serviks karsinomu olan kadınların alınan örneklerde güçlü beraberlik gösterdiği papillomavirus tip 16 a ve b altgruplarının bulunması ile çözümlenmiş gözükmemektedir. Bununla beraber böyle buluşların yokluğunda pozitif bir PCR sonucunun önemi belirsiz kalabilir. Burada güçlendirilecek spesifik DNA segmentinin seçilmesi kritik olacaktır.

Son bir zorluk, kitle taramalarında PCR'nun potansiyel uygulanımının, reaksiyon ve ürünlerini saptamada kullanılan prosedürler zahmetli olduğu için kısıtlı olmasıdır."

### PCR'nun Medikal Kullanım Alanları

Bilindiği gibi enfeksiyöz ve genetik hastalıklar yabancı ya da aberan DNA'nın varlığı ile karakterize olduğu için bununla ilgili medikal alanlar PCR'nun diagnostik uygulamasından faydalanmaya başla-

mışlardır. Bu tekniğin başlıca medikal kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir.

#### (1) HLA Tiplemesinde

İmmünolojiye PCR'nun girişi HLA tipleme ile olmuştur. HLA class-II antijenleri, allel spesifik oligonukleotid problemleri kullanılarak saptanmıştır. Yüksek kopye miktarı, genellikle Southern blotting ile saptanamayan sekansların başarı ile tespitini sağlamıştır.<sup>121</sup>

Ayrıca, HLA Ag'leri ile hastalıklar arası ilişkilerin saptanmasında da kullanılabilir. HLA class -II genlerinin analizi şimdi rutin olarak kullanılabilir. Bu hız, hassasiyet ve maliyet yönünden serolojik tiplemeden üstün bulunmuştur.<sup>122</sup>

#### (2) Hücre reseptör ve ya antikor çeşitliliğinin tanımlanması

T hücre reseptör repertuarını saptamada, bu stratejinin otoimmün hastalıklarda periferik kan, timus veya tutulan dokuların hücrelerinden elde edilen nükleer materyale uygulanabilir olması gereği açıktır. Ayrıca, total DNA kullanıldığı için ilgili T hücre klonlarından spesifik T hücre reseptörlerinin amplifikasyonu şimdi çok kolay olmaktadır.<sup>123</sup>

#### (3) Patojenlerin tespitinde

PCR'nun duyarlılığı, konvensiyonel kültür teknikleri ile identifiye edilmesi zor olan patojenlerin tespitine izin verir. Klamidya ve mikobakteriler gibi müşkülpatojenlerin ve özellikle retroviruslar olmak üzere birçok viral patojenin saptanmasında kullanılabilir. Bu imkanın sağlanmasıdır.

Ayrıca, romatoid artrit, multiple skleroz veya diyabet gibi otoimmün bozukluklarda patojenlerin rolünün saptanmasında ve yine patojenlere immüno- lojik cevabın anlaşılmasında çok geniş kullanım alanı bulmuştur.<sup>124</sup>

Kanser-virus ilişkisinin araştırılmasında da kullanılmıştır. Bu testle saptanan kanser-virus ilişkileri şunlardır:

- (1) HTLV-I ve lösemi,
- (2) Papillomavirus ve servikal Ca,
- (3) EBV ve Hodgkin Hastalığı (1,2,14,15)

Bakterilerin sınıflandırılmasında ise, 16S rRNA- larının saptanarak incelenmesi son zamanlarda önemli bir gelişme olarak gündeme gelmiştir. Bu yolla bir çok yeni tür bakteri saptanmıştır. Buna, H.pylori'nin Campylobacter türleri ve diğer bakterilerden ayrımı için yapılan bir çalışmayı örnek verebiliriz. Bu çalışmada diğer bakterilerden H.pylori'yi ayıran 16S rRNA genine karşı spesifik primerler dizayn edilerek PCR'nda kullanılmıştır. Seri dilu- syonlarda H.pylori genomik DNA'sının 1 pg kadar az

miktarında bile deneysel tespiti mümkün olurken Campylobacter spp., E.coli ve diğer m.o.lardan amplifikasyon mümkün olmamıştır.<sup>125</sup>

Viruslara gelince, son yıllarda immunosupressif ve sitotoksik ilaçların gitgide artan kullanımına paralel bir şekilde, ayrıca AIDS'in bir sonucu olarak, ağır viral enfeksiyonlar sık rastlanan komplikasyonlar haline gelmişlerdir. Spesifik etkenin bilinmesinin, daha doğru prongoz, klinik araştırmaların ve antibiyotik kullanımının azaltılması ve daha iyi tedavi ile uyum açısından belirgin yararları vardır. Yine, antiviral kemoterapide de önemli gelişmeler olmuştur. Bu nedenle hızlı viral tanıya talep, son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Bu hızlı viral tanı yöntemleri arasında son yıllarda PCR'da katılmıştır.<sup>126</sup> bu arada uzun süredir etyolojik ajan saptanamayan bir çok hastalıklarla virusların ilişkisi olabileceği ortaya çıkmıştır. Örneğin: Bizim için tarihi ve tıbbi önemi olan Behçet Sendrom'lu hastaların periferik kan lökositlerinde HSV-1 DNA'si saptanmıştır.<sup>127</sup> Yine, CMV ile aterosklerozun ilişkisi olabileceği ileri sürülmüştür.

PCR ile saptanabilen bazı ajanlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

#### (3) Hematolojik malignansilerde minimal hastalığın tespitinde

Lenfoid malignansiler, sıklıkla amplifiye edilebilen eşsiz sekanslara sahip oldukları için PCR testiyle

Tablo1. PCR ile saptanabilen bazı ajanlar: (2,3,19,20,21,22,23,24,25)

I.Viruslar	
(1)	IIIV
(2)	IIIV-1
(3)	CMV
(4)	Hepadnavirus
(5)	Papillomavirus
(6)	H.simplex vims
(7)	V. /osier vims
(8)	Human parvovirus B19
(9)	Hepatitis B vims
(10)	Yavaş vimsler (BK ve JC)
(11)	EBV
(12)	Rotavirus
H.Bakteriler	
(1)	Hnlerolojik E.coli
(2)	L.pneumophila
(3)	Mycobacterim'lar
(4)	Ohlamydia'lar
(5)	H.pylori ve, CampylobacterTer
(6)	Mycoplasma'lar
(7)	Borrelia'lar
(8)	Toksijenik C. difficile
III.Parazitler	
(1)	Trypanosoma cnizi
(2)	Toxoplasma gondii

**Tablo 2.** Tanı ve patogenezinin araştırılmasında PCR kullanılan otoimmün hastalıklar:<sup>11</sup>

I-Tanı	
(D)	Orak Hücreli Anemi
(2)	Beta-Talasemi ve Hemoglobin 11 Hastalığı
(3)	Fenilketonüri
(4)	Diyabet
(5)	Hemofili A ve B
(6)	Faktör VIII mutasyonu
(7)	Alfa-1 Antitripsin Eksikliği
(8)	Lehr's İlerediler Optik Distrofisi
(9)	Apolipoprotein mülasyonlan
(10)	Duchene's Mısküler Distrofisi
(11)	Leseli-Nyhan Sendromu
(12)	Huntington's Hastalığı
(13)	Résiduel Lösemi
(14)	Kistik Fibrozis
(15)	Leufotri yayılımı
II-Patogenez	
(D)	Diabetes mellitus
(2)	Pemphigus vulgaris
(3)	Myaslenia Gravis
(4)	Multiple sklerozis
(5)	Onkogenlere bağlı kanserler

saptanabilir. Bunun gibi sekanslar, sıklıkla foliküler lenfomadaki 14:18 translokasyon gibi bir translokasyon ile ilgilidir. Böyle bir translokasyona karşılık gelen primerlerle, herhangi bir diğer yöntemle tespit edilmeyen bir tümörün ayrılması mümkün olmaktadır. Yine KML'de 9:22 translokasyonun varlığı PCR ile tespit edilebilmiştir. <sup>12</sup> Ayrıca, PCR ile minimal residüel lösemilerin saptanması da mümkün olmuştur. <sup>C4</sup>

#### (4) Otoimmün hastalıkların genetik haritasının çıkarılmasında

PCR, birçok insan genetik hastalığının tanısında ve patogenezinin araştırılmasında da rol oynamıştır. Bu hastalıkların ve sendromların bazıları Tablo 2'de gösterilmiştir. <sup>12)</sup>

#### (5) Lenfokin miktarlarının saptamada

İmmün cevaba yol açan tek tek hücrelerden veya hücre gruplarından lenfokin mRNA'sının miktarının tayini; insitu hibridizasyon, Northern blot analizi gibi standart tekniklerle zor yapılmaktadır. mRNA'da gerçekleştirilen PCR, bazı growth faktör kopyelerinin düzeylerinin tayininde hassas bir indikatördür. Bu tek hücrelerden, platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-alfa ve beta (TGF-alfa ve TGF-beta) RNA fenotipine uygulanmıştır. PCR'nda görülen platodan dolayı bu tekniğin tam olarak kantitatif sonuç vermesi zordur. Fakat, onlar hücrelerin küçük miktarlarında, lenfokin transkripsiyonu hakkında faydalı bilgiler verebilirler. <sup>13)</sup>

#### Sonuç

PCR, son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki en heyecan verici gelişmedir. Konvansiyonel metodlarla saptanması zor olan DNA moleküllerinin, saptanabilecek düzeye getirilmesini sağlayan PCR bir çok alanlarda kullanım alanı bulmuştur.

Ancak, şu anda bazı problemlerin tam olarak ortadan kaldırılamamış olması bu yeni testin rutin kullanımını önlemektedir ve konulan diğer tanı testleri ile konfirme edilmesi ihtiyacı duymaktadır.

Çok yakın bir gelecekte, belki de 2.000 yılından da önce bu test rutin kullanıma girecek, özellikle referans laboratuvarlarının vazgeçilmez bir tanı aracı olma özelliğini taşıyacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Eisteiu DI. The Polymerase Chain Reaction: A New Method of Using Molecular genetics for Medical Diagnosis. N Engl J Med 1990; 322:178-83.
2. Bell J. The Polymerase Chain Reaction. Immunology Today 1989;10:351-55.
3. Erlich IIA, Gelfand DU, Saiki RK. Specific DNA Amplification. Nature 1988; 331:461-2.
4. Saiki RK, Gelfand DU, Stoffel S, Scharf SJ, Iliguchi R, Horn GT, Mnlis KB, Erlich HA. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science 1988; 239:487-91.
5. Colombe BW. Hlistocompatibility Testing. In: Stiles DP, Terr IA, eds. Basic and Clinical Immunology. Appleton and Lange Med Pnbl 1991; 308-10.
6. Wild J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. J Clin Microbiol 1990; 28:1300-7.
7. Rososki R. Nucleic acid resolution by electrophoresis. In: Frochlich EI, ed. Ryins\* Medical Boards Review Basic Sciences. Philadelphia: J.B. Lippincott Company 1989; 374.
8. Kemp DJ, Smith DB, Foot SJ, Samars N, Peterson MG. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. Proc Natl Acad Sei 1989; 86:2443-7.
9. Lee PC, Ilallsworth P. Rapid viral diagnosis in perspective. BMJ 1990; 300:1413-9.
10. Kwok S, Iliguchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339:237-8.

- IL I.o **Y M**, Molin**I WZ**, Fleinhig **KA**. False positive results with the PCR. *The Lancet* 1988; 2:679.
12. Paal« S, Wilson AC. PCR reveals cloning artefacts. *Nature* 1988;334:387-8.
13. Loll EY, illiot JE, Cwirla S, Lanier I.L, Davis MM. PCR with Single-sided Speedily: Analysis of T' cell receptor delta chain. *Science* 1989; 243:2 17 20.
14. Brocksinilh D, Angel CA, Pringle JII, Lander I. LBV DNA in Hodgkin's Disease: Amplification and (election using the PCR. *J Med Microbiol* 1991; 34:xii.
15. Coales PJ, D'Adremic AJ, Slavin G. EBV DNA in Hodgkin's Disease. *J Med Microbiol* 1991; 34:xiii.
16. Ho SA, Lewis LA, Wyalt JI, Dixon ML, Seeker DA, Tompkins DS, Taylor GR. H.pylori detection by PCR of The gene encoding 16S rRNA in fresh and paraffin embedded material. *J Med Microbiol* 1991; 34:xiii.
17. Sludd M, et al. Detection of HSV-1 DNA in patients with Behcet's Syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by The PCR. *J Med Microbiol* 1991; 34:39-43.
18. Melnick JL, Adam E, Dellakey ME. Possible Role of Cytomegalovirus in Atherogenesis. *JAMA* 1990; 263:2204-7.
19. Koto N, On C, Kalo II, Hartley SL, Brown VK, Dowel VR, Veno K. Identification of Toxigenic C.difficile by The PCR *J Clin Microbiol* 1991;29:33-7.
20. Jensen JS, Uldum SA, Soidergard-Audersen J, Vuust J, Lind K. PCR for detection of Mycoplasma genitalm in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 1991; 29:46-50.
21. Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgrat MV, Radolf JD. Sensitive detection of T.Pallidm by using The PCR. *J Clin Microbiol* 1991; 29:62-9.
22. Kido S, Ozaki T, Asada II, Iligaslu K, Kondo K, Hayakawa Y, Morisliima T, Lakahaslh M, Yainanashi K. Detection of V/V DNA in Clinical samples from patients with VZ by Tile PCR. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 76-9.
23. Hermans PWM, et al. Specific Detection of M.tuberculosis Complex Strains by PCR. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1204-13.
24. Bartram CR, et al. Detection of minimal residual leukemia by PCR. *Bone Marrow Transplant* 1990; 6 snpp: IP 4-8.