

Güncel Bilgiler Işığında Viral Hepatit Tanısında Moleküler Biyolojik Yöntemler

Hakan ABACIOĞLU*

* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Son yıllarda nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, DNA dizi analizi ve moleküler klonlama gibi moleküler biyolojik yöntemler, diğer birçok alanda olduğu gibi, moleküler ve klinik viroloji alanındaki çalışmalarda da giderek yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmaların yoğunlaştığı alanlardan biri de tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olan viral hepatitlerdir. Geçtiğimiz on yıl içinde moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak tanımlanan HCV, HEV, HGV/GBV-C ve TTV gibi yeni viral hepatit etkenlerine 1999 yılı içinde SEN-V adı verilen bir DNA virüsü de eklenmiştir^[1].

Benzer yöntemler ve yaklaşımlar, yalnızca yeni etkenlerin tanımlanmasında değil; eski ve yeni hepatit virüslerinin genetik çeşitliliğinin anlaşılmasında, biyolojik, klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde ve daha güvenilir tanı testlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda da önemli katkılar sağlamaktadır. Bu yazının ilk bölümünde, güncel önemi ve moleküler tanı testlerinin performansını doğrudan etkileyebilmesi nedenleriyle, hepatit virüslerinin genetik çeşitliliği, ülkemiz verileri de sunulurken ele alınmaktadır. Sonraki bölümlerde, viral hepatit araştırmalarında ve tanısında kullanılan moleküler

Current Molecular Biological Methods for the Diagnosis of Viral Hepatitis

Key Words: Viral hepatitis, Diagnosis, Molecular biological methods
Anahtar Kelimeler: Viral hepatit, Tanı, Moleküler biyolojik yöntemler

biyolojik yöntemler ve bu yöntemlerin kullanıldığı testlerde performansı etkileyen faktörler tartışılmaktadır. Son bölümde ise, moleküler teknolojilerdeki yeni gelişmeler ve bunların viral hepatit tanısına getirebilecekleri açılımlardan söz edilmektedir.

HEPATİT VİRÜSLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ

Hepatit A Virüsü (HAV)

Tek bir serotipi olan HAV'ın 7 farklı genotipinin bulunduğu; bunlardan 1, 2, 3 ve 7'nin insanlarda, 4, 5 ve 6'nın maymunlarda infeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir^[2,3]. Ancak, genotipler arasında antijenik farklılık bulunmamakta; herhangi bir genotiple enfekte olan ya da HM175 suşu ile aşılanan bireylerde tüm tiplere karşı bağışıklık oluşmakta ve bu bireylerdeki antikor yanıtı genotipden bağımsız olarak varolan serolojik testlerle saptanabilmektedir^[3].

Hepatit B Virüsü (HBV)

HBV'nin 6 genetik tipi (genotip A-F) olduğu gösterilmiştir^[4,5]. Bilinen 9 HBsAg subtipi (adw2, adw4, adr, adrq-, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4 ve ayr) bu genotiplerden biri ya da birkaçı ile ilişkilidir (Tablo 1). HBV genotipleri ile virüs suşlarının coğrafik kökeni arasında anlamlı bir korelasyon vardır. Genotip A suşları; Kuzey Avrupa ve Afrika'da, genotip B ve C; Uzak Doğu'da, genotip D; Akdeniz ve Orta Doğu ülkelerinde, genotip E; Batı Afrika'da, genotip F ise Orta ve Güney Amerika ülkelerinde yaygın

dır^[5,6]. HBV genotipleri arasında patojenite yönünden farklılıklar olduğunu düşündürülen bulgular vardır. Japonya'da yapılan büyük ölçekli bir çalışmada serotip adr (genotip C) ile infekte olan hastalarda karaciğer hastalığının ve HBeAg pozitifliğinin serotip adw (çoğunluğu genotip B) ile infekte olanlara göre daha ağır olduğu gösterilmiştir^[7]. Doğu Asya kökenli hastalarda yapılan bir başka çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir^[8]. Ülkemizde HBV genotiplerine ilişkin yayınlanmış bir çalışma henüz yoktur. Ancak, HBsAg subtiplerinin belirlenmesine yönelik 158 örneğin iki farklı yöntemle incelendiği bir çalışmanın sonuçları olasılıkla genotip D'nin baskın olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada, 152 örnekte ayw, 1 örnekte adw belirlenmiş; 1 örnek ise tiplendirilememiştir^[9].

Genotipik farklılıkların HBV-DNA ölçümlerinde de etkili olabileceğini düşündürülen veriler vardır. Heerman ve arkadaşları bir sıvı faz hibridizasyon testi olan Abbott Genostics testinin genotip D virüslere olan duyarlılığının A tipi virüslere göre 1.5-2 kat daha fazla olduğunu bildirmiştir^[10].

Hepatit C Virüsü (HCV)

HCV için henüz bir hücre kültür modeli olmadığından, bu virüsün tiplendirilmesi hemen tümüyle virüs suşları arasındaki nükleotid farklılıklarının belir-

lenmesine, yani genotiplendirmeye dayanmaktadır. Şu ana kadar HCV'nin en az 6 farklı genotipi ve 100'den fazla subtipi tanımlanmıştır^[11,12]. HCV genotipleri arasında coğrafi dağılım, antijenisite, patojenite ve interferona yanıt gibi özellikler yönünden farklılıklar vardır^[13-16]. Ülkemizdeki HCV genotiplerinin dağılımına ilişkin birçok çalışma yapılmış ve HCV infeksiyonlarının büyük çoğunluğunun daha patojen ve interferona yanıtın düşük olduğu kabul edilen tip 1 (özellikle de tip 1b) virüslere bağlı olduğu gösterilmiştir^[17]. HCV ile infekte hastalarda prognoz belirlenmesi ve tedaviye yanıtın izlenmesi açısından genotiplendirme ve viral yük ölçümleri önerilmektedir. Viral yük belirlenmesinde sık olarak kullanılan kantitatif PCR, dallanmış DNA (bdNA = branched DNA) ve NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) teknolojilerine dayalı ticari testlerin farklı genotipik dizileri eş duyarlılıkta saptayamadığı gösterilmiştir^[18,19].

Hepatit D Virüsü (HDV)

Delta antijenini kodlayan genomik bölgedeki dizilerin filogenetik analizi yoluyla HDV'nin şu ana kadar üç ana genotipi tanımlanmıştır^[20]. Genotip I virüsler tüm dünyada yaygındır ve 3 subtipi (Ia-Ic) bulunmaktadır^[21]. Yakın tarihte, genotip II HDV dizilerine benzer yeni bir monofiletik grup tanımlanmış ve

Tablo 1. Dünya üzerinde HBV genotipleri ve HBsAg subtiplerinin dağılımı*

HBV genotipi	HBsAg subtipi	Coğrafi dağılımı
A	adw2	Avrupa, Kuzey Amerika, Afrika
	ayw1	Afrika
B	adw2	Uzak Doğu
	ayw1	Uzak Doğu
	adrq-	Pasifik
C	adr/ayr	Uzak Doğu
	adw	Japonya, Endonezya
	adr	Uzak Doğu, Pasifik
D	ayw4	ABD
	ayw2/ayw3	Tüm Dünya
E	ayw4	Afrika
F	adw2	Güney Amerika
	adw4	Polinezya, Alaska, Orta ve Güney Amerika
	ayw4	Güney Amerika

* Kaynak 6'dan alınmıştır.

bu grubun IIb olarak adlandırılması önerilmiştir^[22]. Tip II virüslerin tip I'e göre daha az patojen olduğunu düşündüren kanıtlar vardır^[23]. Bir başka çalışmada ise genotip III enfeksiyonları ile HBV genotip F arasındaki ilişki tanımlanarak; bu iki virüsün koinfeksiyonlarında fulminan hepatit görülme riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir^[24]. Türkiye'den yapılan bir çalışmada kronik delta hepatitli hastaların tümünün genotip I ile infekte olduğu bildirilmiştir^[25]. Medline taramasında HDV genotipleri ile antijenite arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir makaleye ulaşılmıştır. Rusça olan makalenin özetinden anlaşıldığı kadarı ile Delta antijeninin 65-80. aminoasitleri arasındaki immünodominant bölge genotip-spesifik antikor yanıtına neden olmaktadır^[26].

Hepatit E Virüsü

Nükleotid ve aminoasit dizilerinin filogenetik analizleri ile HEV'in en az 3 genetik grubunun varlığı gösterilmiştir^[27,28]. Beş ayrı subtipin (a-e) tanımlandığı birinci grubun (genotip 1) prototipi Burma'dan izole edilen virüstür^[27]. İkinci grupta Meksika'dan izole edilen suş, üçüncü grupta ise Amerikan izolatları yer almaktadır. Genotip 3 virüslerden HEV-US1 suşu subtip 3a, US2 ise 3b olarak sınıflandırılmaktadır^[29]. Amerika'da domuzlardan izole edilen bir HEV suşunun HEV-US1 izolatu ile nükleotid düzeyinde %92 benzer olması HEV'in farklı türleri infekte edebildiğini ve zoonotik enfeksiyonlara neden olabileceğini düşündürmektedir^[27,29]. Değişik araştırmacıların sıçan, koyun, domuz ve primatların HEV enfeksiyonlarına duyarlı olduklarını gösteren çalışmalarını da bu görüşü destekler niteliktedir^[27,28,30]. Wang ve arkadaşları, Çin'de akut hepatitli olgulardan izole edilen HEV suşlarının bilinen 3 genotipten farklı olduğunu göstererek, bu izolatların genotip 4 olarak sınıflandırılmasını önermişlerdir^[31]. Schlauder ve arkadaşları ise, bir İtalyan ve iki Yunan izolatu için üç yeni genotipi temsil ettiğini bildirmişlerdir^[32]. Bu veriler, HEV'deki genetik çeşitliliğin yaygın olduğunu ve henüz tanımlanmamış yeni genetik tiplerin var olabileceğini düşündürmektedir. Anti-HEV testlerinin genotip-bağımlı olabileceğini düşündüren veriler vardır. Şu anda kullanımda olan Anti-HEV testlerinin çoğunda temel olarak Burma kökenli genotip 1 virüs antijenleri kullanılmaktadır. Bu testlerle, US-1 (genotip 3a) HEV enfeksiyonunda yalnızca IgG tipi antikorların belirlenebildiği, IgM tipi antikorların ise belirlenemediği bildirilmiştir^[33].

Hepatit G Virüsü (GBV-C)

Genomundaki dizi farklılıklarına dayanarak HGV'nin şu ana kadar 4 ana genetik grubu gösteril-

miştir^[34,35]. Bu grupların coğrafik dağılım özellikleri farklılıklar göstermektedir. Grup 1 virüsler daha çok Batı Afrika'da, grup 2 virüsler ABD ve Avrupa'da, grup 3 ve 4 virüsler ise Doğu ve Güneydoğu Asya ülkelerinde enfeksiyonlara neden olmaktadır^[35]. Türkiye'de yapılan 8 olgulu bir çalışmada, olguların tümünde genotip 2 enfeksiyonu belirlenmiştir (Dr. S. Erensoy ile kişisel görüşme). HGV enfeksiyonları PCR ile HGV-cDNA dizilerinin ve EIA yöntemi ile anti-E2 antikorlarının gösterilmesi ile belirlenmektedir. Anti-E2 antikorlarının genellikle HGV-RNA ortadan kalktıktan sonra ortaya çıktığı ve geçirilmiş enfeksiyon sonrası bağışıklığı gösterdiği düşünülmektedir^[36]. Bu nedenle, aktif HGV enfeksiyonlarının tanısında PCR tek seçenektir. HGV-PCR uygulamalarında kullanılan primerlerin çoğu 5'-NCR dizilerine özgüdür. Bu bölge iyi korunmuş olmasına karşın genotiplere özgü polimorfik diziler içermektedir^[34]. Özellikle, antisense primerlerin tasarımında polimorfizmin dikkate alınmaması amplifikasyon etkinliğini belirgin olarak azaltabilmektedir^[37].

TT Virüs

TTV ile spesifik bir patoloji arasında neden-sonuç ilişkisi henüz kesin olarak gösterilmemiş olmasına karşın son araştırmalar TTV'nin farklı coğrafik bölgelerde genel popülasyon arasında çok yaygın olduğunu göstermektedir^[38,39]. Yeni tasarlanan PCR primerleri ile Japonya'da sağlıklı bireylerin %92'sinde TTV varlığı gösterilmiştir^[40]. Ancak bu primerlerin de tüm TTV genotiplerini saptamadığı bildirilmiştir^[39]. Diğer DNA virüsleri ile karşılaştırıldığında TTV genomları önemli düzeyde genetik çeşitlilik göstermektedir. Şu ana kadar TTV'nin 3 ana genotipi ve bir dizi subtipi tanımlanmıştır^[38]. Türkiye'de yapılan bir çalışmada 8 olguda genotip 2, bir olguda ise genotip 1 TTV enfeksiyonu belirlenmiştir^[41]. Yapılan çalışmalarda, TTV'nin tavuk, koyun, sığır ve domuz gibi çiftlik hayvanlarında da yaygın olarak bulunduğu gösterilmiş ve bunların insan enfeksiyonları açısından kaynak olabilecekleri öne sürülmüştür^[39]. TTV'nin genel popülasyonda çok yaygın bulunması ve virüsün safrada ve dışkıda saptanmış olması TTV enfeksiyonlarının parenteral yanı sıra enterik yolla da bulaşabileceğini düşündürmektedir^[38,39,42].

SEN-V

Dia-Sorin araştırmacıları tarafından tanımlanan bu yeni DNA virüsünün henüz bilimsel bir toplantıda ya da dergide tanıtımı yapılmamıştır^[1]. Firmanın web sayfalarında yer alan bilgilere göre parenteral yolla bulaşan bu yeni virüsün kronik Ne-A, Ne-E hepatitlerin %68'inden sorumlu olduğu öne sürülmek-

Tablo 2. Hepatit virüsleri

Virüs	Aile	Genomik yapı	Bilinen genotipler	Türkiye'de saptanan genotipler	Temel bulaş yolu	Genotipik değişikliklerin tanı testlerine etkisi ¹
HAV	Picornaviridae	RNA	I-VII	?	Fekal-oral	Yok
HBV	Hepadnaviridae	DNA	A-F	D ²	Parenteral	Olası
HCV	Flaviviridae	RNA	1-6	çoğunluğu 1; 2,3,4'de var	Parenteral	Var
HDV	Deltavirus	RNA	I-IV	I	Parenteral	Olası
HEV	Caliciviridae ³	RNA	I-VII	?	Fekal-oral Zoonotik?	Olası
HGV	Flaviviridae	RNA	1-4	2	Parenteral	Var
TTV	Circinoviridae ⁴	DNA	1-3	2 ve 1	Parenteral Fekal-oral? Zoonotik?	Var
SEN-V	?	DNA	?	?	Parenteral	?

1: Tartışma için metne bakınız. 2: ayw serotipinin çoğunun genotip D olduğu varsayılmıştır (kaynak 9). 3: HEV şu anda Caliciviridae içinde sınıflandırılmamaktadır. 4: Önerilen addir. Henüz kesinleşmemiştir.

te ve HCV, HBV ve HIV ile infekte hastaların sırasıyla, %11, %20 ve %30'da SEN-V koinfeksiyonlarının saptandığı belirtilmektedir^[43].

VİRAL HEPATİTLER ALANINDA KULLANILAN MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER

Viral hepatitlerin tanısında ve araştırmalarında kullanılan moleküler biyolojik yöntemler en genel hatlarıyla amplifikasyon, hibridizasyon, polimorfizm analizleri, DNA dizi ve filogenetik analiz gibi nükleik asittabanlı yöntemlerdir. Bu yöntemler amaca bağlı olarak tek ya da birarada kullanılabilir. Bu yöntemlerin teknik ayrıntıları bu yazının amacını aşmaktadır. Burada, söz konusu yöntemler, uygulamada karşılaşılan sorunlar ve performanslarını etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla kısaca tanıtılmaktadır.

Amplifikasyon Yöntemleri

Tanıda en sık kullanılan yöntem olan amplifikasyon yöntemleri, kullanılan amplifikasyon yaklaşımına göre;

- Hedef,
- Probe,
- Sinyal amplifikasyon yöntemleri olarak sınıflandırılabilir.

Bu yöntemlerin tümünde hedef nükleik asit dizisi ile bu diziyeye özgün oligonükleotidlerin hibridizasyonu söz konusudur (Tablo 3).

PCR (polymerase chain reaction), hedef DNA ya da cDNA dizilerinin, özgün primerler ve termofilik bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılması yöntemidir. TAS (Transcription amplification system), NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) ve 3SR (Self sustained sequence replication) yöntemleri ise temel olarak hedef RNA moleküllerinin çoğaltıldığı yöntemlerdir. Transkripsiyona dayalı amplifikasyon yöntemleri olarak da bilinen bu yöntemlerde, hedef RNA molekülleri önce özgün primerler ve ters transkriptaz kullanılarak cDNA'ya çevrilmekte; ardından oluşan cDNA molekülleri kalıp olarak kullanılarak RNA polimeraz yardımı ile bol miktarda RNA molekülü sentezlenmektedir. PCR'dan farklı olarak bu yöntemlerde tepkime eş-ısıllıdır (izotermal) ve dolayısıyla bir ısı döngü aygıtına (thermal cyler) gerek duyulmamaktadır. Hedef amplifikasyon yöntemleri ile hem kalitatif hem de kantitatif sonuç elde edilebilmektedir.

LCR (Ligase chain reaction), hedef DNA dizilerine komplementer iki oligonükleotidin (birincil primerler) uç uca hibridizasyonu ve uçların DNA ligaz ile yapıştırılması esasına dayanır. Böylece oluşan ligan ürünleri, daha sonraki basamaklarda ikincil

Tablo 3. Sık kullanılan bazı in vitro nükleik asit amplifikasyon yöntemleri*

Amplifikasyon yöntemi	Kullanılan enzimler	Amplifikasyon dizgesi	Ticari kitlere örnek
Hedef			
• DNA/cDNA PCR	Ters transkriptaz (cDNA PCR uygulamalarında)	RNA → cDNA → DNA DNA → DNA	Cobas Amplicor (Roche)
• NASBA	Termofilik DNA polimeraz Ters transkriptaz RNase H RNA polimeraz	RNA → cDNA → RNA	NASBA (Organon Teknika)
Probe			
• LCR	Termofilik DNA ligaz	RNA → cDNA → probe DNA → probe	Abbott LCR (Abbott)
Sinyal			
• bDNA	Yok	DNA → sinyal RNA → sinyal	Quantiplex (Chiron)

*Kısaltmalar için metne bakınız.

primerlerin bağlanması için kalıp görevi üstlenerek, primer/probe dizilerinin çoğaltılmasını sağlar.

Bir sinyal amplifikasyon yöntemi olan bDNA (branched DNA), hedef nükleik asit dizilerinin çok sayıda dal içeren bir DNA probu ile hibridizasyonu ve ardından bu proba özgün olan ve herbiri yaklaşık 3000 alkalın fosfataz molekülü içeren ek problemlerle işaretlenmesine dayanır. Enzim moleküllerinin yoğunluğu uygun bir substrat kullanılarak bir lumino-metre yardımı ile gösterilir.

Hibridizasyon Yöntemleri

Viral hepatit alanında daha çok HBV infeksiyonlarının tanısında kullanılan bu yöntemler, hedef nükleik asit dizileri ile bu dizilere özgün problemlerin katı ya da sıvı fazda hibridizasyonu temeline dayanır. Hibridizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği çeşitli yöntemlerle izlenebilir. En sık kullanılan yaklaşımlardan biri, problemlerin radyoaktif ya da enzimatik işaretlenmesidir. Örneğin, Abbott HBV Genostics testinde radyoaktif işaretli problemler kullanılmakta ve hedefe bağlanan problemlerden yayılan radyoaktivite miktarı bir gamma sayıcısında okunarak örneklerdeki HBV miktarı saptanmaktadır. Diğer bir yaklaşım da, hibridizasyonun monoklonal antikolar kullanılarak gösterilmesidir. Digene Hybrid Capture testinde hedef DNA dizileri ile RNA problemler hibridize edilmekte ve ardından DNA-RNA hibridlerine özgü monoklonal antikolar kullanılarak viral yük belirlenebilmektedir. Hibridizasyon yöntemlerinin analitik duyarlılığı kural olarak amplifikasyon yöntemlerinden 2-4 log düşüktür.

Polimorfizm Analizleri

Hepatit virüslerinin genetik çeşitliliğinin klinik, biyolojik ve epidemiyolojik korelasyonlarının gösterilmesi genotiplendirme yöntemlerinin yaygınlaşmasına neden olmuştur. Genotiplerinin belirlenmesinde en doğrudan yaklaşım nükleotid dizilerinin filogenetik analizi olmasına karşın, bu yaklaşımın göreceli pahalı olması ve uzun sürmesi, çok sayıda örneğin kısa sürede incelenmesine olanak veren ve kolay uygulanabilir başka yöntemlerin geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır. Bunlar arasında:

- Genotipe özgü öncüller (primerler) kullanılan PCR teknikleri,
- PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilerek, elde edilen kalıpların (paternlerin) belirlenmesine dayanan RFLP (restriction fragment length polymorphism) teknikleri,
- Genotipe özgü işaretli problemlerin kullanıldığı blotting teknikleri,
- Ters hibridizasyona dayalı teknikler (örneğin, Inno-LIPA),
- Heterodupleks mobilite teknikleri,
- Single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analizleri sayılabilir.

Geçtiğimiz yıllarda tanımlanan “cleavase fragment length polymorphism (CFLP)” analizi, kolay uygulanabilmesi ve maliyeti yönünden RFLP ve SSCP analizlerine bir alternatif olabilir^[44]. Moleküler

biyolojik tekniklere dayalı bu yaklaşımların yanısıra HCV için tanımlanan, genotipe özgü antijenik determinantlara karşı antikor yanıtının belirlendiği serotiplendirme yöntemleri de bulunmaktadır^[14].

DNA Dizi ve Filogenetik Analiz Yöntemleri

Hepatit virüsleri ile yapılan filogenetik analizlerde genellikle uygun genomik bölgeler PCR ile çoğaltılarak, elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizilimi belirlenir. Elde edilen diziler, önceden bilinen dizilerle karşılaştırılarak filogenetik ağaç çizilir. Virüslerle yapılan filogenetik çalışmalarda çoğunlukla nükleotid dizileri arasındaki genetik uzaklıklar karşılaştırılır. Genetik uzaklık, karşılaştırılan iki dizide birbirinden farklı olan nükleotid pozisyonlarının sayısını gösteren değerdir. Farklı modeller kullanarak genetik uzaklıkları belirleyen birçok bilgisayar programı bulunmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan programlardan biri olan "Phylip" paketi içinde hizalama, parsimony, maximum likelihood, neighbor-joining gibi çok sayıda yöntemin kullanılmasına olanak veren 31 ayrı program bulunmaktadır. Bu programlar, internetten "http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html" adresinden ücretsiz olarak yüklenebilmektedir.

NÜKLEİK ASİT TABANLI TESTLERDE SORUNLAR: HBV ve HCV DENEYİMİ

Nükleik asit tabanlı testler viral hepatitlerin tanısında, tedaviye yanıtın ve prognozun belirlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak, birçok laboratuvarın kendi geliştirdikleri testleri kullanmaları ve bunların yeterince standardize edilmemesi sonuçlarının güvenilirliğini azaltmaktadır. Bu konuda çarpıcı bir örnek, HCV tanısında PCR kullanan 31 laboratuvarın ancak %16'sının bir referans panelindeki tüm örnekleri doğru olarak belirleyebilmesidir^[45].

Örnek alımı, saklanması ve işlenmesi; virüs kökenleri arasındaki genomik değişkenlikler ve buna bağlı olarak primer seçimi; tepkime koşulları ve kontaminasyon gibi çok sayıda değişken nükleik asit tabanlı testlerin performansını etkilemektedir^[46].

İyi standardize edilmiş ticari kitlerin ve sistemlerin kullanımı bu sorunların bir bölümüne çözüm getirmekle birlikte, özellikle, kantitatif sonuç veren testlerde iki temel sorun halen güncelliğini korumaktadır. Birbirleriyle yakından ilişkili bu sorunlardan ilki; testlerin analitik duyarlılık, özgüllük, kantitasyon aralığı gibi performans özellikleri yönünden önemli farklılıklar göstermesi ve buna bağlı olarak farklı testlerle alınan sonuçların birbirleriyle karşılaştırılmasında yaşanan güçlüklerdir^[19,47-50].

HBV-DNA kantitasyonunda kullanılan iki ayrı sıvı faz hibridizasyon testinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; özellikle yüksek HBV-DNA konsantrasyonlarında, bDNA (Chiron) ile elde edilen ölçümlerin Digene Hybrid Capture II (DHC) testinden yaklaşık 3 kat fazla olduğu gösterilmiş ve iki testin sonuçlarının $DHC (pg/mL) = 3.19 \times [bDNA (Meq/mL)]^{0.866}$ formülü kullanılarak karşılaştırılabileceği öne sürülmüştür^[51]. Lunel ve arkadaşları, NASBA (Organon), Monitor (Roche) ve bDNA (Chiron) testlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada; testlerin duyarlılıklarını sırasıyla, %99, %94 ve %88 olarak belirlemiş ve NASBA ile ölçülen HCV-RNA konsantrasyonlarının bDNA'dan 10 kat, Monitor'den ise 100 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir^[52]. Kantitatif HCV-RNA testlerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada; Monitor 2.0 testinin tüm HCV genotiplerini eş duyarlılıkla belirleyebilmesine karşın, kantitasyon aralığının dar olduğu ($10^3 - 5 \times 10^5$ kopya/mL) ve bu aralığın dışında kalan virüs konsantrasyonlarını olduğundan düşük saptadığı bildirilmiştir^[19]. Aynı çalışmada, Chiron bDNA-2 testinin kantitatif aralığı $2 \times 10^5 - 5 \times 10^7$ kopya/mL olarak ölçülmüş ve testin tip 6a virüs konsantrasyonlarını 2-4 kat düşük belirlediği gösterilmiştir. HCV ve HBV enfeksiyonlarında virüs konsantrasyonlarının, aynı hastadan değişik zaman dilimlerinde alınan örneklerde, 1-5 log düzeyinde dalgalanmalar gösterebilmesi, kantitasyon aralığı dar olan testlerle yapılan hasta izlemlerinin yanıltıcı olabileceğini ve tedavi öncesi virüs yükünün belirlenmesinde tek bir ölçümün yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir^[47,53]. Aynı testin farklı versiyonlarının duyarlılıkları ve kantitatif aralıkları da farklı olabilmektedir. Pawlotsky ve arkadaşları, bDNA 1 ve bDNA 2 kullanarak yaptıkları karşılaştırmalı HCV-RNA ölçümlerinde, elde edilen değerler arasında doğrusal bir ilişki olmadığını göstererek, bDNA 1 ile elde edilen sonuçların güvenilirliğini sorgulamışlardır^[54].

Kantitatif testlerde karşılaşılan sorunlardan ikincisi ise, nükleik asitlerin yeterince ekstrakte edilememesi; primerlerin/probların genotiplere bağlı olarak duyarlılıklarında farklılıklar olması ve kullanılan kalibratörlerin niteliği gibi nedenlerle testlerin hatalı sonuçlar verebilmesidir^[19,47-50]. Kantitatif HBV-DNA testlerinin sonuçları arasında 120 kata varan farklılıkların belirlenmesi bu bağlamda ilgi çekici bir örnektir^[19,48-51,55]. Bu farklılıkların; testlerin performans özelliklerinin optimize edilmemesine, testlerin genotip-bağımlı olmasına, yetersiz ekstraksiyona ve hibridizasyon türü testlerde kalibratör olarak kullanılan klonlanmış HBV-DNA'nın virion DNA'sından

farklı davranmasına bağlı olduğu gösterilmiştir^[49,50]. Virion genomunda uzun ipliğin 5'-ucunda kovalan olarak bağlı bir protein bulunurken, klonlanmış HBV-DNA'da bu protein yoktur^[56]. Ekstraksiyon sırasında bu proteinin uzaklaştırılmaması durumunda, virion DNA'sı fenolik fazda kalmakta ya da pürifikasyon kolonlarından ayrıştırılmamakta ve sonuçta hasta örneklerinde HBV-DNA konsantrasyonu doğru olarak ölçülememektedir^[50]. Kalibratörler ile viral genomlar arasındaki yapısal farklılıklar kantitatif HCV-RNA testlerinde de sorunlara neden olmaktadır. Mellor ve arkadaşları, bu testlerde kalibratör olarak kullanılan subgenomik RNA transkriptlerindeki internal baz çiftleşmelerinin viral genomdan farklı olduğunu; bunun da primer ya da problemlerin bağlanmasını etkileyerek kalibratörler ile viral genomik diziler arasında hibridizasyon ve amplifikasyon etkinliği yönünden farklılıklara neden olduğunu göstermişlerdir^[19]. Dünya Sağlık Örgütü, kantitatif HCV-RNA testlerinde objektif bir kalibrasyonu sağlamak amacıyla 10^5 ünite/mL HCV-RNA içeren bir standartı (HCV-WHO International Standard: 96/790) kullanıma sunmuştur^[57]. Kantitatif HBV-DNA testlerinde standardizasyonu sağlamak amacıyla Eurohep grubu genotip A ve D HBV ile infekte iki ayrı hastadan ortalama 2.7×10^9 HBV-DNA/mL virion içeren referans serumları hazırlamıştır^[50]. Genotip A için hazırlanan referans örneğin DSÖ standardı olarak kabul edilmesi gündemdedir^[57].

Kantitatif testlerde, genotip-bağımlılığı önemli bir sorundur. HBV-DNA kantitasyonunda sık kullanılan Abbott Genostics testinin yinelenebilirliğinin çok iyi olmasına karşın, genotip D virüsleri genotip A'ya göre 1.5 kat daha iyi belirleyebildiği gösterilmiştir^[50]. Bu veri ışığında, Genostics testi ile yapılan viral dinamik çalışmalarında 10^{11} virion/gün olarak hesaplanan günlük virüs salınımı miktarının 10^{13} virion/gün olarak düzeltilmesi gerektiği öne sürülmüştür^[50,58]. Kantitatif HCV-RNA testlerinin ilk versiyonlarının kullanıldığı çalışmalarda, tip 2 ve tip 3 HCV ile infekte bireylerde interferon yanıtının tip 1 virüslerle infekte olanlara göre daha yüksek bulunması, yanlışlıkla, ilk grupta viral yükün daha düşük bulunması ile açıklanmıştır^[59,60]. Daha sonra yapılan çalışmalar, bu testlerin tip-1 dışındaki HCV genotiplerinin ölçümünde yeterince duyarlı olmadığını göstermiştir^[18,19]. Bu testlerde kullanılan primer ve problemlerin, virüsün en iyi korunmuş bölgesi olan 5'-NCR bölgesinden türetilmiş olmalarına karşın, bu bölgede yer alan tipe özgü polimorfik diziler nedeniyle tip 1 dışındaki HCV dizilerinin yeterli etkinlikte saptanamadığı anlaşılmıştır^[61]. Kwok ve arkadaş-

ları, PCR tepkimelerinde primer:hedef nükleik asit dupleksinin 3'-ucundaki pürin:pürin ve pirimidin:pirimidin uyumsuzluklarının amplifikasyon etkinliğini 100 kat oranında düşürebildiğini göstermiştir^[62]. Bütün bu veriler, primer ve problemlerin tasarımında genotipe-özü polimorfik dizilerin dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

YENİ TEKNOLOJİLER ve AÇILIMLAR

Nükleik asit tabanlı testler viral hepatitlerin tanısında, tedaviye yanıtın izleminde ve prognozun belirlenmesinde önemli katkılar sağlamasına karşın, performans ve standardizasyon sorunları bu testlerin kullanımını önemli oranda kısıtlamaktadır. Hedef amplifikasyonuna dayanan testlerin analitik duyarlılıkları sinyal amplifikasyon ve hibridizasyon testlerinden daha iyi olmasına karşın, kantitatif özellikleri yönünden performansları ikincilerden daha düşüktür. Bu nedenle; kolay uygulanabilir, hızlı, yinelenebilir, analitik duyarlılığı yüksek ve kantitasyon aralığı geniş test sistemlerinin geliştirilmesi gereklidir. Şu anda kullanımda olan test sistemlerinin iyileştirilmesine yönelik çabalar yanısıra, gerçek-zamanlı PCR (real time PCR), dijital PCR transkripsiyon güdümlü amplifikasyon (transcription mediated amplification) ve çapraz bağlanma (cross-linking assay) gibi teknikler sözedilen gereksinimlere bir yanıt oluşturabilir^[48,63-66]. Örneğin, HBV ve HCV için tanımlanan gerçek-zamanlı PCR testlerinin kantitatif aralığı 10^1 - 10^8 genom/mL olarak bildirilmektedir^[63,64]. Bu gelişmelere karşın, testlerde genotip-bağımlılığı ve kalibrasyon sorunlarının da çözülmesi gereklidir. Ticari kitlerin son versiyonlarında tüm virüs genotiplerini eş duyarlılıkla belirleyebilen primer/problemlerin kullanılması ve kalibrasyon için uluslararası referans serumlarının geliştirilmiş olması umut verici gelişmelerdir. Diğer yandan, çeşitli firmaların nükleik asit ekstraksiyon basamağını otomatize eden aygıtları devreye sokmaları ile standardizasyon açısından önemli sorunlardan birinin daha giderilebilmesi sağlanacaktır.

Son yıllarda analitik sistemlerin minyatürizasyonunda yaşanan gelişmeler, mikroyongalar (microchip) üzerinde hibridizasyon ve amplifikasyon tepkimelerinin gerçekleştirilebilmesini sağlamıştır^[67]. Bu tür aygıtlar, aynı anda çok sayıda örneğin kısa bir sürede işlemlenebilmesine olanak vermektedir. Sözgelimi, gerçek-zamanlı PCR tekniği ile, silikon yongatabanlı spektrofotometrik bir ısı döngü aygıtı kullanılarak, bir örnekteki bakterilerin toplam 7 dakika içinde belirlenebildiği bildirilmiştir^[68]. Bu tür sistemlerin ve tekniklerin kullanımı ile, yakın gelecekte, hepatit virüslerinin tanısında, genetik tiplerin belirlen-

mesinde, viral yük ölçümlerinde ve antiviral ajanlara direncin izleminde önemli gelişmeler olması beklenmelidir. Ek olarak, minyatürize sistemlerin işletim maliyetinin düşük olması, nükleik asit tabanlı testlerin kan bankalarında rutin olarak kullanılabilmelerini ve dolayısıyla, transfüzyonlara-bağlı infeksiyonların hemen tümüyle engellenebilmesini sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Cohen J. Report of a new hepatitis virus has researchers intrigued and upset. *Science* 1999;285:644-5.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992;73:1365-77.
- Koff RS. Hepatitis A. *Lancet* 1998;351:1643-9.
- Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992;73:1201-8.
- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.
- Blits L, Pujol FH, Swenson PD, et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998;36:648-51.
- Shiina S, Fujino H, Uta Y, et al. Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I. Analysis of 1744 HBsAg carriers. *Am J Gastroenterol* 1991;86:866-71.
- Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999;179:775-82.
- Türkyılmaz AR, Bozdayı AM, Wend U, ve ark. Hepatit B virusu taşıyan Türk hastalarda HBV yüzey geni subtiplerinin belirlenmesi. III Ulusal Hepatoloji Kongresi, P45, İstanbul, Türkiye, 1999.
- Heerman KH, Gerlich WH, Chudy M, Schaefer S, Thomssen R and The Eurohep Pathobiology Group. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations. *J Clin Microbiol* 1999;37:68-73.
- Simmonds P, Yap PL, Dow BC, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-9.
- Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, et al. The entire nucleotide sequences of three hepatitis C virus isolates in genetic groups 7-9 and comparison with those in other eight genetic groups. *J Gen Virol* 1998;79:1847-57.
- McOmish F, Yap PL, Dow BC, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An international collaborative study. *J Clin Microbiol* 1994;32:884-92.
- Bhattacharjee V, Prescott LE, Pike I, et al. Use of NS4 peptides to identify type-specific antibodies to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. *J Gen Virol* 1995;76:1737-48.
- Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, et al. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol* 1994;43:291-6.
- Bell H, Hellum K, Harthug S, et al. Genotype, viral load and age as independent predictors of treatment outcome of interferon- α 2a treatment in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Infect Dis* 1997;29:17-22.
- Abacıoğlu YH. Hepatit C virusun virolojik ve moleküler özellikleri. *Aktüel Tıp Derg* 1997;2:143-50.
- Hawkins A, Davidson F, Simmonds P. Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2 and 3 by Quantiplex HCV RNA assay versions 1 and 2, Roche Monitor Assay, and an in-house limiting dilution method. *J Clin Microbiol* 1997;35:187-92.
- Mellor J, Hawkins A, Simmonds P. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol* 1999;37:2525-32.
- Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9016-20.
- Zhang YY, Tsega E, Hansson BG. Phylogenetic analysis of hepatitis D viruses indicating a new genotype I subgroup among African isolates. *J Clin Microbiol* 1996;34:3023-30.
- Wu J-C, Chiang T-Y, Sheen I-J. Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gen Virol* 1998;79:1105-13.
- Wu J-C, Choo K-B, Chen C-M, Chen T-Z, Huo T-L, Lee S-D. Genotyping of hepatitis D virus by restriction fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D. *Lancet* 1995;346:939-41.
- Casey JL, Niro GA, Engle RE, et al. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peuvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 1996;174:920-6.
- Şengezer T, Erkan Ö, Yurdaydın C, Bozkaya H, Uzunalımoğlu Ö, Bozdayı AM. Hepatit Delta virus RNA'sının RT-PCR ile belirlenmesi ve kronik delta hepatitli Türk hastalarda HDV-RNA genotiplerinin RFLP yöntemi ile saptanması. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi, İstanbul, 1999.
- Dementava EV, Kruglov IV, Pimenov VK, Semiletov İuA. Antigenic activity of delta-antigen peptides corresponding to three genotypes of the delta hepatitis virus. *Vopr Virusol* 1998;43:217-20.
- Erker JC, Desai SM, Schlauder GG, Dawson GJ, Musahwar İK. A hepatitis E virus variant from the United States: Molecular characterization and transmission in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 1999;80:681-90.
- Arankalle VA, Paranjape S, Emerson SU, Purcell RH, Walimbe AM. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India. *J Gen Virol* 1999;80:1691-700.
- Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9860-5.
- Maneerat Y, Clayson ET, Myint KSA, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol* 1996;48:121-8.

31. Wang Y, Ling R, Erker JC, et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 1999;80:169-77.
32. Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol* 1999;57:243-51.
33. Kwo PY, Schlauder GG, Carpenter HA, et al. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 1997;72:1133-6.
34. Muerhoff AS, Smith DB, Leary T, Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK. Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of 5'-untranslated and coding region sequences. *J Virol* 1997;71:6501-8.
35. Naito H, Win KM, Abe K. Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in Southeast Asia. *J Clin Microbiol* 1999;37:1217-20.
36. Quarleri JF, Mathet VL, Feld M, et al. GB virus C/Hepatitis G virus groups and subgroups: classification by a restriction fragment length polymorphism method based on phylogenetic analysis of the 5' untranslated region. *J Clin Microbiol* 1999;37:1340-7.
37. Forns De Tan X, Alter HJ, Purcell RH, Bukh J. Evaluation of commercially available and in-house reverse transcription-PCR assays for detection of hepatitis G virus or GB virus C. *J Clin Microbiol* 1997;35:2698-702.
38. Prescott LE, MacDonald DM, Davidson F, et al. Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. *J Gen Virol* 1999;80:1751-8.
39. Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* 1999;80:2115-20.
40. Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, Yoshida N, Mishiro S. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of primers. *Hepatol Res* 1998;12:233-9.
41. Erensoy S, Sayiner AA, Sertöz R, Özacar T, Bilgiç A. TTV infection in Turkish blood donors. European Meeting on Molecular Diagnostics Abstracts. 13-16 October 1999. Den Haag. (abstract published in) *J Microbiol Meth* 1999;38:232.
42. Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non A-G hepatitis. *J Infect Dis* 1999;179:1245-8.
43. http://www.copalis.com/news/senv_hepatitis_fact_sheet.htm
44. Lyamichev V, Brow MAD, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 1993;260:778-83.
45. Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993;341:722-4.
46. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clin Chem* 1998;44:12-26.
47. Kamisango K, Kamogawa C, Sumi M, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:310-4.
48. Zaaijer HL, ter Borg F, Cuypers HT, Hermus MC, Lelie PN. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1994;32:2088-91.
49. Quint WGV, Heijntink RA, Schirm J, Gerlich WH, Niesters HGM. Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection. *J Clin Microbiol* 1995;33:225-8.
50. Heermann KH, Gerlich WH, Chudy M, Schaefer S, Thomssen R and The Eurohep Pathobiology Group. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations. *J Clin Microbiol* 1999;37:68-73.
51. Ho SKN, Chan TM, Cheng IKP, Lai KN. Comparison of the second-generation Digene Hybrid Capture Assay with the Branched-DNA assay for measurement of Hepatitis B virus DNA in serum. *J Clin Microbiol* 1999;37:2461-5.
52. Lunel F, Cresta P, Vitour D, et al. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA and Monitor assays. *Hepatology* 1999;29:528-35.
53. Halfon P, Bourliere M, Halimi G, et al. Assessment of spontaneous fluctuations of viral load in untreated patients with chronic hepatitis C by two standardized quantitation methods: branched DNA and Amplicor Monitor. *J Clin Microbiol* 1998;36:2073-5.
54. Pawlotsky JM, Martinot-Peignoux M, Poveda JD, et al. Quantification of hepatitis C virus RNA in serum by branched DNA-based signal amplification assays. *J Virol Methods* 1999;79:227-35.
55. Butterworth LA, Prior SL, Buda PJ, Faogali JL, Cooksley WG. Comparison of four methods for quantitative measurement of hepatitis B viral DNA. *J Hepatol* 1996;64:686-91.
56. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980;21:801-9.
57. Gerlich WH. Significance of viral nucleic acid detection in hepatitis B and C. In European Association for the Study of Liver and Turkish Association for the Study of Liver, EASL Postgraduate Course Syllabus and Abstracts Book, Istanbul, 26 June 1998:39-43.
58. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4398-402.
59. Mahaney K, Tedeschi V, Maertens G, et al. Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology* 1994;20:1405-11.
60. Yamada G, Takatani R, Fishi F, et al. Efficacy of interferon alfa therapy in chronic hepatitis C patients depends primarily on hepatitis C virus RNA levels. *Hepatology* 1995;22:1351-4.
61. Smith DB, Davidson F, Yap P-L, et al. Variation in the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *J Gen Virol* 1995;76:1749-61.
62. Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nuc Acid Res* 1990;18:999-1005.
63. Abe A, Inoue K, Tanaka T, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:2899-903.

64. Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, et al. Real time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. Gastroenterology 1999;116:636-42.
65. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:9236-41.
66. Lai VCH, Guan R, Wood ML, Lo SK, Yuen MF, Lai CL. Nucleic acid-based cross-linking assay for detection and quantification of hepatitis B virus DNA. J Clin Microbiol 1999;37:161-4.
67. Kricka LJ. Miniaturization of analytical systems. Clin Chem 1998;44:2008-14.
68. Belgrader P, Bennett W, Hadley D, et al. PCR detection of bacteria in seven minutes. Science 1999;284:449-50.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Hakan ABACIOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

35340, Inciraltı-İZMİR

Makalenin Geliş Tarihi: 23.12.1999

Kabul Tarihi: 21.02.2000

flora

İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
DERGİSİ'ne MAKALE GÖNDERECEK OLAN YAZARLARA

DUYURU

LÜTFEN DERGİMİZE MAKALE GÖNDERMEDEN ÖNCE
DERGİNİN YAZARLARA BİLGİ BÖLÜMÜNDE BELİRTİLEN

YAZIM KURALLARININ TÜMÜNE UYGUN OLUP

OLMADIĞINI GÖZDEN GEÇİRİNİZ

TEŞEKKÜRLER