

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ve MİKROBİYOLOJİDE KULLANIM ALANLARI

Süheyla TÜRKYILMAZ*

Ömer M. ESENDAL**

Geliş Tarihi : 02.02.2000

Özet: İnfeksiyöz hastalıkların teşhisinde genellikle, direkt ve indirekt yöntemler kullanılır. İnfeksiyonların teşhisini sağlayan klasik direkt yöntemler (konvansiyonel teşhis yöntemleri) klinik bulgulara, otopsi bulgularına, etken izolasyon ve identifikasyonuna, antijenik materyallerin saptanmasına ve serolojik tekniklere dayanmaktadır. Bu yöntemler bazen başarılı sonuçlar vermediği gibi latent infeksiyonlarda da hatalı pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu gibi olgularda, mikroorganizmaya ait genetik materyallerin (DNA ya da RNA) veya proteinlerin saptanmasını amaçlayan, kesin sonuçlar veren biyoteknolojik teşhis yöntemlerinin kullanılmaları oldukça faydalı olmaktadır. Bu biyoteknolojik yöntemler içerisinde en yenilerinden birisi olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), spesifitesi ve sensitivitesinin oldukça yüksek olması gibi nedenlerle araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, infeksiyöz hastalıklar, kullanım alanları.

POLYMERASE CHAIN REACTION AND ITS USE IN MICROBIOLOGY

Summary: Direct and indirect methods are generally used in the diagnosis of infectious diseases. Classical direct (or conventional) diagnostic methods usually rely on clinical and post mortem findings, isolation and identification of the causative agents, detection of the antigenic substances and of specific antibodies by serologic methods. These techniques may sometimes give insufficient results or may cause false positive results in latent infections. In such cases, the use of biotechnologic methods for the detection of microbial genetic materials (DNA or RNA) or proteins would be beneficial. Polymerase Chain Reaction (PCR), one of the newest of these biotechnologic methods, is used widely in research studies because of its high sensitivity, specificity, reliability and accuracy.

Key Words: Polymerase Chain Reaction, infectious diseases, usage areas.

İnfeksiyöz etkenlerin erken, kesin ve güvenilir bir şekilde teşhis edilmelerini sağlayan ileri teknikler ve biyoteknolojik teşhis yöntemleri Tablo-1'de gösterildiği gibi gruplandırılabilirler.

Nükleik asit hibridizasyonu ile tanı yöntemi, nükleik asitlerin son derece özgün olmaları ve son derece stabil moleküller oluşturabilmeleri gibi avantajlara sahiptir. Hibridizasyon teknikleri ile genellikle, materyallerde (doku, organ, hücre kültürü v.s.) bulunan hastalık ajanlarının veya bu dokulara ait hücre DNA'larındaki spesifik genlerin işaretli prolarla ortaya konması amaçlanmaktadır^{2,23-25}. Nükleik asit problemleri ile hibridizasyonla tanı birçok mikroorganizma için yeterince özgün olmasına karşın; aynı derecede duyarlı değildir. Hedef nükleik asit incelenecek materyalde çok az miktarda bulunuyorsa hibridizasyonla saptanamaz. Böyle durumlarda, ilk kez 1985 yılında Saiki ve ark.¹⁷ tarafından hemoglobinopatilerin teşhisinde uygulanan, bir çoğaltma prosedürü kullanılabilir. Dolayısıyla da hibridizasyon tekniğinin duyarlılığı artırılabilir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) denilen bu yöntemle incelenecek materyalde çok az bulunan nükleik asitlerin sayısı amplifikasyon yöntemleriyle artırılmakta ve daha sonra da saptanabilir düzeye erişen bu moleküllerin varlığı hibridizasyon teknikleri ile gösterilebilmektedir^{2,11,23}.

PCR bakteri, virus, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan; oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir^{7,15,18}. Bu hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA' lar arasında olsalar bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilip kolayca identifiye edilebilir^{2,18}.

PCR, DNA'nın ortamda polimeraz enzimi ve DNA sentezi için uygun maddeler bulunması halinde karşıt sıralarını sentezleyebilme yeteneğinden faydalanılarak oluşturulan bir reaksiyondur. DNA veya RNA dizilerinin sayısal olarak artırılması esasına dayanan PCR' in en önemli yönü , özel bir DNA dizisi seçip çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir. Bu özellik, sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, ayrıca DNA' nın analiz edilmesini de sağlamaktadır^{17,23}.

PCR'in başlıca kullanım alanları; mikrobiyolojik çalışmalar, adli tıp ve genetik bozuklukların belirlenmesi şeklinde özetlenebilir². PCR' in tıp ve diğer bilim alanlarında oldukça yaygın olarak kullanılmasında önemli rol oynayan faktörler arasında sıcaklığa

* Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın-TÜRKİYE

** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Tablo I. Hastalık etkenlerinin teşhisinde en çok kullanılan ileri teknikler ve biyoteknolojik yöntemler (2,6).
Table I. Advanced techniques and biotechnological methods frequently used in the identification of disease agents.

1. İmmunojenik substanslarının saptanması		2. Genetik materyallerinin saptanması	
A. Antijenlerin	B. Antikorların	A. Nükleik asit hibridizasyon teknikleri	
a. ELISA	a. ELISA	a. Southern Blot Tekniği	c. Dot Blot Tekniği
b. RIA	b. RIA	b. Northern Blot Tekniği	d. İn Situ Hibridizasyon
c. FA	c. FA	B. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri	
d. İmmunperoksidaz	d. İmmunperoksidaz	a. Transkripsiyonla amplifikasyon Teknikleri	
e. İmmunblot	e. İmmunblot	- Transkripsiyona Dayalı Amplifikasyon (TAS)	
f. Protein Dot Blot		- Self-Sustained Sequence Replication (SSSR)	
g. İn Situ İmmunperoksidaz		- Standart Displacement Amplification (SDA)	
		b. Prob Moleküllerinin Amplifikasyon Teknikleri	
		- Ligaz Zincir Reaksiyonu (LCR)	
		- RNA Prob Moleküllerinin Q Beta Replikaz ile amplifikasyonu	
		c. DNA Amplifikasyon Teknikleri	
		- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	

dirençli bir DNA polimeraz enziminin bulunması ve PCR cihazlarının (Thermocycler) geliştirilmesi sayılabilir.

PCR' in Temel Bileşenleri

1. *Matris veya Kalıp DNA*: PCR için başlangıç materyali çoğaltılacak baz dizisine sahip genetik materyaldir. Eğer hedef zincir olarak RNA' dan faydalanılacaksa, reaksiyon başlamadan önce revers transkriptaz enzimi kullanılarak RNA komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilir, sonra da bu cDNA, PCR için kalıp olarak kullanılır. Tüm bu işlemlerde en önemli nokta, amplifiye edilecek DNA' nın fonksiyonel özellikte olmasıdır^{2,13,16}.

2. *Primerler (Oligonükleotidler)*: İşaretlenmiş 4-10 nükleotidden oluşmuş sekanslar olup sentez için basamak oluşturan, DNA' yı PCR tekniği ile amplifiye edebilmek için kullanılan, başlatıcı yardımcı oligonükleotidlere primer denir. Bu kısa, tek sarmallı DNA molekülleri DNA matrisinin belli bir bölümünün sonu ile komplementer yapıya sahiptir. Bunlar hedef DNA' nın öyle sekanslarına karşı hazırlanmışlardır ki, başka kontaminant DNA' lar ile çarpaz reaksiyon vermezler. Bu nedenle de hedef DNA baz sıralarının çok iyi bilinmesi gerekmektedir^{2,15,25}.

3. *Polimeraz Enzimleri*: PCR' da in vitro olarak DNA' nın amplifikasyonu işleminde, 1987 yılında bulunan, *Thermus aquaticus*' dan elde edilen sıcaklığa dirençli bir DNA polimeraz enzimi (Taq-DNA polimeraz) kullanılmıştır. Böylece Taq-DNA polimeraz, sıcaklığa dirençli olarak kullanılan ilk enzim olmuştur. Taq-DNA polimeraz enzimi sıcaklığa duyarlı olan diğer enzimlere göre daha kullanışlıdır. Çünkü; her denatürasyon siklusunda ortama yeni enzim ilavesine gerek yoktur. Ayrıca, primerlerin bağlanmaları yüksek sıcaklıklarda daha spesifik olmaktadır. Taq-

DNA polimeraz enzimi dışında *Thermus thermophilus* DNA-polimeraz, *Bacillus stearothermophilus* DNA-polimeraz, *Thermus brockianus* DNA-polimeraz ve çok yüksek termofilik özellikteki *Thermus litorolis* DNA polimeraz ticari olarak bulunan diğer enzimlerdir^{2,15,25}.

4. *Deoksinükleotid-Trifosfat (dNTPs) Karışımı*: Nükleik asit ya da yeni DNA sarmallarının sentezlenebilmesi için dATP, dTTP, dGTP, dCTP olarak bilinen 4 tip dNTP'a gereksinim duyulmaktadır. Nötralize edilmiş, molaritesi belirlenmiş dörtlü setler halinde kullanılmaları halinde reaksiyonun güvenilirliği artmaktadır. Sentezlenecek olan hedef DNA' nın uzunluğu, sayısı, döngünün kaç kez tekrarlanacağı doğrudan doğruya dNTPs miktarı ile yakından ilgili olup; bunlar reaksiyondaki fosfat grubunun da esas kaynağını oluştururlar .

5. *PCR' da Kullanılan Tampon Solüsyonlar*: 10 mM Tris (pH: 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, jellatin, % 0,01 NP₄₀ ve Tween 20' dir.

6. *Reaksiyon Koşulları*: PCR' da zaman, sıcaklık ve siklus sayısı; hangi DNA' nın hangi primer ile amplifiye edileceğine bağlıdır^{3,5,7,15}.

Bir PCR İşleminin Yapılışı ve Prensipleri

Hedef DNA sekansının in vitro olarak enzimatik amplifikasyonunu sağlayan, oldukça güvenilir moleküler biyolojik bir teknik olan PCR; genetik-infeksiyöz hastalıklar ve kanser vakalarının klinik olarak teşhisi başta olmak üzere oldukça geniş bir uygulama alanı bulmuş, çeşitli araştırmacılar tarafından "bakterisiz klonlama tekniği" olarak isimlendirilmiştir^{7,18}.

PCR işlemi ile DNA amplifikasyonunun prensibi sıcaklık, zaman ve siklus sayıları istenebildiği gibi

ayarlanabilen özel cihazlar yardımıyla aşağıdaki aşamalarda gerçekleştirir.

1. FAZ: Ayrışma (Denatürasyon) : Bu aşamada, çift iplikçikli kalıp DNA' nın denatürasyonu sağlanır. Test ortamında buffer, dNTPs, hedef DNA' ya spesifik olan ve primer olarak isimlendirilen sentetik tek iplikçikli 15-30 bazlık oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı bir enzim (Taq polimeraz) bulunmaktadır. Bu aşamada ısı, 91-94 °C olup; reaksiyon 1-2 dakika sürmektedir.

2. FAZ: Primerlerin Bağlanması (Birleşme) : Birinci aşama sonucunda denatüre olarak tek iplikçikli hale dönüşen DNA sekanslarının her birinin 3'- uçlarındaki (terminus) nükleotidlere uygun sıcaklıkta primerlerin bağlanması (primer annealing) bu aşamada gerçekleşir. Isının birden bire 50 °C dolaylarına düşürülmesiyle primerler DNA matrisi üzerinde yoğunlaşır. Bu aşama genellikle 37- 65 °C arasında değişmekte olup; reaksiyon 2-5 dakika sürmektedir.

3. FAZ: Polimerizasyon (Uzama): Isıya dayanıklı polimeraz enzimi, primerler ve kalıp olarak da tek iplikçikli DNA kullanılarak in vitro koşullarda çift iplikçikli DNA' nın sentezlenmesinin (primer elongation, primer extension) sağlandığı aşamadır. Reaksiyon 70-72°C arasında yani Taq DNA polimeraz enzimi için optimal sıcaklıkta, 2-3 dakikada tamamlanmakta olup; polimerizasyon işlemi 5 --> 3 yönünde gerçekleşmektedir^{7,10,15,21}. Şekil-1'de bu durum gösterilmektedir .

PCR gibi amplifikasyon teknikleri hiçbir zaman direkt teşhis metodları olarak kabul edilemezler. Bu yöntemler, hastalıkların tanısında büyük yardımı ve desteği olan çok duyarlı, spesifik, çabuk ve güvenilir sonuçlar veren biyoteknolojik amplifikasyon yöntemleridir. Tanı ise, sonraki aşamalarda hibridizasyon yöntemleri ile konulmaktadır.

PCR' in Modifikasyonları

Oldukça sık kullanılan PCR' nin en önemli modifikasyonları şöyle özetlenebilir:

1. Invers (Tersine Dönmüş) PCR,
2. Asimetrik PCR,
3. Homopolimerli PCR,
4. In situ PCR,
5. Hot Start PCR,
6. Kantitatif PCR,
7. Nested PCR,
8. Hedef DNA' nın Amplifikasyonu,
9. Multipleks PCR^{2,13}.

Ayrıca, son yıllarda konvansiyonel PCR' a alternatif

olarak geliştirilen Booster PCR tekniği ile atların ve kümes hayvanlarının dışkılarından Salmonella türlerinin varlığı 10-12 saat içerisinde belirlenmiştir; ancak bu tekniğin çok özgün olmasına karşın maliyetinin konvansiyonel PCR' ın iki katı kadar olduğu da bildirilmektedir¹⁶.

PCR Uygulamalarında Hatalı Sonuçlardan Kaçınmak İçin;

PCR uygulamalarında, kontaminasyona bağlı olası bir yalancı pozitifliği engellemek için aşağıdaki önlemlerin alınmasında fayda vardır. Bunlardan bazılarını şöyle özetleyebiliriz:

* Her çalışma sonrasında, kullanılan laboratuvar ve içindeki malzemeler germisidal etkili UV ışınları ile sterilize edilmelidir. Primerler UV ışınına kalıp DNA' dan daha dayanıklıdır.

*Yüksek ısıdan etkilenmeyen, reaktiflerin hazırlanmasında kullanılan deiyonize sular ve tampon çözeltiler sterilizasyon amacıyla otoklavlanabilir. Primerler ve nükleotidler otoklavlanamaz.

* PCR için özel olarak hazırlanmış pipetler (bu pipetlerin iç kısımlarına herhangi bir reaktifin kaçması ve sonuçta buna bağlı bir kontaminasyonun oluşması söz konusu değildir) ve pipet uçlarının kullanılması gerekmektedir; ayrıca, reaksiyon sırasında pozitif ve negatif kontroller de kullanılmalıdır.

* PCR ürünlerinin incelenmesinde kullanılan aletler 1M HCl ile yıkanmalıdır. Kontaminasyonların önlenmesi için kullanılan diğer bir uygulama da UNG (Urasil N Glikolaz) sterilizasyonudur. Her deney sonrasında kullanılan malzemelere bulaşmış olan amplifiye ürünler UNG enzimi ile muamele edilerek yıkıma uğratılmakta ve daha sonra sorun oluşturmamaktadır^{3,5,7,11}.

PCR' da çeşitli nedenlere bağlı yalancı negatif sonuçlar da söz konusu olabilir;

* Uygun olmayan bir ekstraksiyon işlemi ya da bunun sonucunda genetik materyalin kaybedilmesi,

* Amplifikasyon işleminin uygun bir şekilde gerçekleştirilememesi,

* Reaksiyonda çeşitli nedenlerden kaynaklanabilecek PCR inhibitörlerinin bulunması,

* Primer seçiminin doğru yapılamaması,

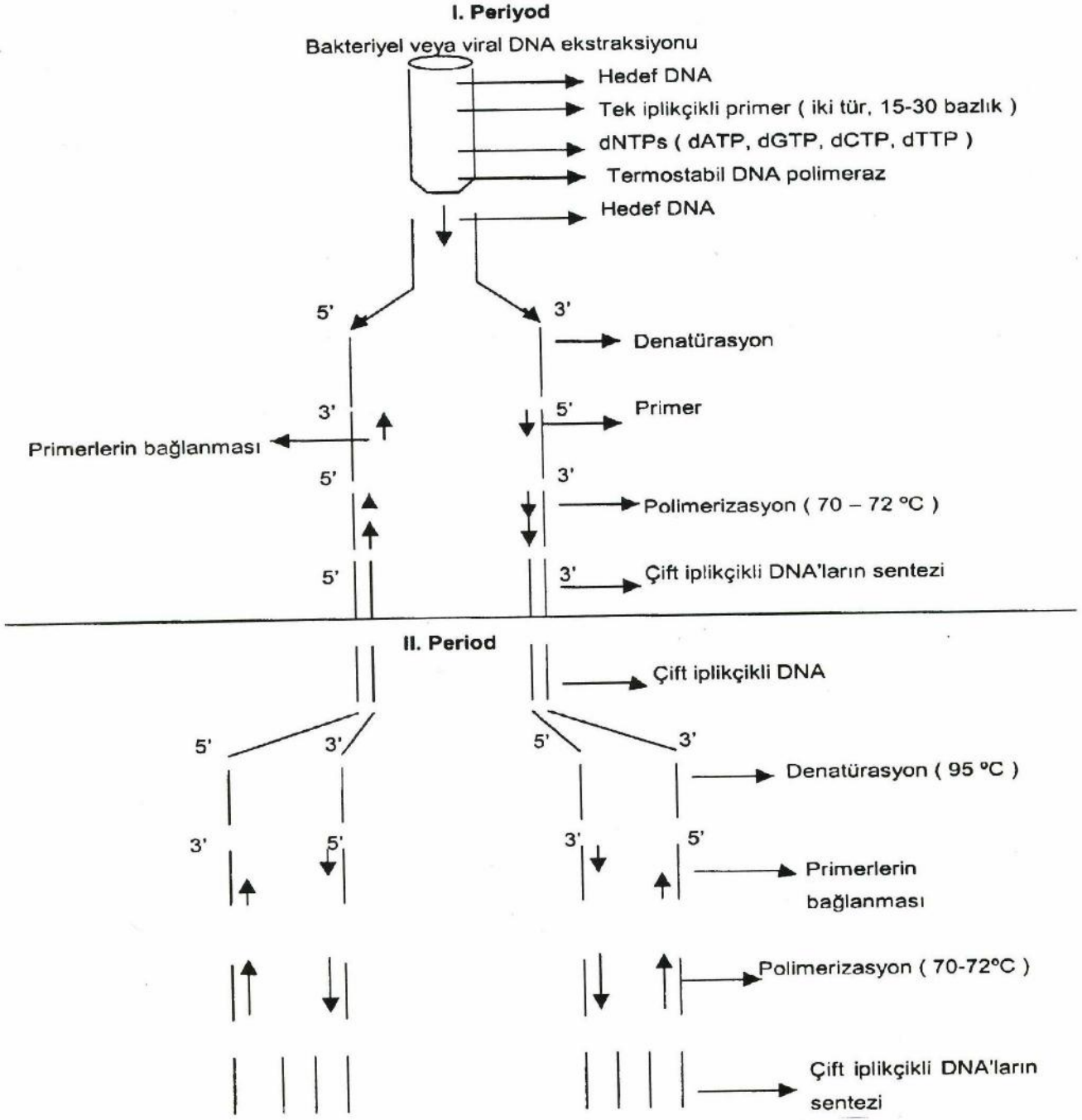
* Etken özellikle RNA olduğunda, uygun saklanamaması nedeniyle genetik materyalin tahrip olması^{3,5,11,25}.

PCR' nun Avantajları

1. Tekniğin çok hızlı aynı zamanda da oldukça spesifik oluşu en önemli özelliklerindedir.

2. Kan, serum, doku, hücre gibi materyallerin yanısıra, oldukça eski zamanlara ait olan kurutulmuş

Şekil 1. Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları².
Figure 1. Polymerase chain reaction.



Bu aşamadan sonra reaksiyon 25-30 kez tekrarlanır.

örneklerden (antropolojik çalışmalarda) de nükleik asitler ekstrakte edilebildiğinden ve hedef DNA'nın çok küçük konsantrasyonlarının bile bu iş için yeterli olabilmesi nedeniyle oldukça pratik bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

3. Toksin oluşturan etkenlerin ve saptanması güç olan toksinlerin, bakteri alt tiplerinin, laboratuvar

koşullarında üretilmeleri oldukça güç olan virusların teşhis edilebilmesini sağlamaktadır.

4. Dirençliliğe neden olan genin belirlenmesi ile antibakteriyel ilaçlara dirençli olan bakterilerin saptanmasında kullanılır. Örneğin, *Staphylococcus aureus*'da methicillin direnç geni PCR ile tesbit edilmiştir.

5. Adli tıpta başta babalık tayini olmak üzere pek çok alanda, populasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalarda giderek yaygınlaşarak kullanılmaktadır.^{2,7,18,22,23,25}

PCR' nun Dezavantajları

1. PCR' nun en büyük avantajı, aslında tekniğin en önemli dezavantajının da kaynağını oluşturur. Şöyleki, ortamda bulunan tek bir kontaminant DNA, eğer reaksiyonda kullanılan primer ile ortak baz sırasına sahip ise aynı oranda çoğalarak reaksiyon sonrası elde edilecek sonuçları olumsuz yönde etkileyecektir.

2. PCR, deneyimli personel gerektirir. Tekniğin yerince duyarlı ve özgün olması, sonuçların doğru bir şekilde yorumlanmasına bağlıdır.

3. Yöntemin pahalı olması kullanılan alet ve malzemelerden kaynaklanmaktadır.^{3,5,7,15}

PCR' da eğer primer bölgeyi içeren DNA parçası zarar görmemiş ise canlı ve cansız bakteriler arasında

bir ayırım yapılamamaktadır. Klasik konvansiyonel tekniklerle cansız bakteriler tesbit edilemezken; PCR ile canlı ya da cansız nükleik asidin tesbit edilmesiyle pozitif sonuç alınabilmektedir. Bu durum yöntemin hem avantajı hem de dezavantajıdır. Avantajı, hammaddenin hijyenik kalitesi hakkında çok önemli bilgiler vermesi, dezavantajı ise ısı işlemi uygulanmış olan gıda maddelerinde sanki bakteriyel kontaminasyon varmış gibi reaksiyon görülmesidir.^{18,24,25}

Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Hayvan Patojenlerinin Saptanması

Laboratuvar ortamında üretilmeyen ya da üretilmesi çok uzun zaman alan bakteriyel patojenleri tanımlama probleminin çözülmesi için PCR ve 16S rRNA filogenez (türlerin zaman içerisinde geçirdikleri evrim) çalışmaları birleştirilmiştir. 16S rRNA, tüm bakterilerde bulunan bir molekül olup; bir bakterinin sınıflandırılabilmesi amacıyla önemli bilgiler içerir. Farklı bakteri türleri arasında evrimsel ilişkinin saptanabilmesi bakterilerde 16S rRNA sekansının nükleik

Tablo 2. Nükleik asit amplifikasyonu ile saptanabilen bazı patojen etkenler.^{2,4,5,8-10,12-14,19,20}
Table 2. Some pathogenic agents that could be detected with nucleic acid amplification.

BAKTERİYEL PATOJENLER		VİRAL PATOJENLER
Aeromonas hydrophila,	Enterococcus faecium,	Herpes virus,
Aeromonas pleuropneumonia,	Escherichia spp.,	Laryngotracheitis virusu,
Erlchia spp.,	Campylobacter spp.,	Pox virus,
Bordetella pertusis,	Haemophilus influenzae,	İnfluenza A virusu,
Borrelia burgdorferi,	Haemophilus paragallinarum	İnfeksiyöz bronşitis virusu
Borrelia coriacea,	Helicobacter pylori,	İnfeksiyöz bursal hastalık virusu
Borrelia spirochetes,	Leptospira spp.,	Reovirus,
Brucella spp.,	Legionella pneumophila,	Newcastle hastalığı virusu,
Bacillus anthracis,	Mycobacterium sp.p.,	Tavuk Anemi virusu
Campylobacter spp.,	Mycoplasma spp.,	Pneumovirus
Coxiella burnatti,	Neisseria spp.,	
Clostridium botulinum,	Pasteurella multocida,	
Clostridium chauvoei,	Pseudomonas aeruginosa,	
Clostridium difficile,	Renibacterium salmoninarum,	
Clostridium perfringens,	Rhodococcus equi,	
Clostridium septicum,	Salmonella spp.,	
Chlamydia pneumonis,	Shigella spp.,	
Chlamydia trachomatis,	Staphylococcus spp.,	
Chlamydia psittaci,	Taylorella equigenitalis,	
Corynebacterium diphtheriae,	Treponema pallidum,	
Cowdria ruminatum,	Ureoplasma urealyticum,	
Dichelobacter nodosus,	Vibrio cholerae,	
	Yersinia spp.	

asit dizilişinin anlaşılması ve bu sekans dizisindeki benzerliklerin ortaya konulabilmesiyle mümkün olmaktadır. Bu nedenle, bilinmeyen bir mikroorganizmanın 16S rRNA sekansının saptanması, bu bakterinin bilinen bir türün üyesi olup olmadığı ya da daha önceden bilinen bir bakteri ile ilişkisi olan yeni bir bakteri olup olmadığı hakkında yeterli bilgi verir¹.

Nükleik asit amplifikasyonu ile saptanan bakteriyel ve viral patojenlerden bazıları Tablo-2'de gösterilmiştir.

Teknik , yurdumuzda ve tüm dünyada Veteriner Hekimlik alanında çeşitli araştırmalarda oldukça sık olarak kullanılmaktadır. Tüm gelişmeler gözönüne alındığında PCR'nun hayvan hastalıklarının epidemiyolojisi, tedavisi ve önlenmesi üzerine çok önemli etkileri olacağı oldukça açıktır.

KAYNAKLAR

- 1 **Abigail A, Salyers D, Whitt D:** Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. ASM Press, Washington DC, 1994.
- 2 **Arda M:** Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara, 1995.
- 3 **Çevik AM:** PCR ve İnfeksiyöz Hastalıklarda Kullanımı. Seminer. S.B. Ankara Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Bölümü, 1994.
- 4 **Chen X, Miflin JK, Zhang P, Blackall PJ:** Development and application of DNA probes and PCR tests for Haemophilus paragallinarum. *Avian Dis*, 40: 398-407, 1996.
- 5 **Diallo IO, Mackenzie AM, Spradbrow PB, Robinson WF:** Field isolates of fowl pox virus contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Dis*, 27:60-66, 1998.
- 6 **Diker KS:** İmmunoloji. Medisan Yayınları Serisi, 37. Ankara, 1998.
- 7 **Erlich AH, Gelfand D, Sninsky JJ:** Recent advances in Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252: 1643-1652, 1991.
- 8 **Garcia M, Jackwood WM, Levisohn S, Kleven HS:** Detection of Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, and M. iowae by multispecies Polymerase Chain Reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis*, 39: 606-616, 1995.
- 9 **Hungjen L, Giamborne JJ, Nielsen B, Liu H:** Molecular characterization of avian reoviruses using nested PCR and nucleotide sequence analysis. *J Virol Methods*, 65:157-167, 1997.
- 10 **Jestin V, Jestin A:** Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). *Arch Virol*, 118: 151-161, 1991.
- 11 **Kwok S, Higuchi R:** Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339:237-38, 1989.
- 12 **Kwon MH, Jackwood MW:** Polymerase Chain Reaction and biotin-labeled DNA probe for detection of Infectious Bronchitis virus in chickens. *Avian Dis*, 37:149-156, 1992.
- 13 **Miwa N, Nishina T, Kubo S, Honda H:** Most probable number method combined with nested PCR for detection and enumeration of enterotoxigenic Clostridium perfringens intestinal contents of cattle, pig and chicken. *J Vet Med Sci*, 59: 557-560, 1997.
- 14 **Oyofa BA, Abd-el-salam M, Churilla M:** Rapid and sensitive detection of Campylobacterspp. from chicken using the Polymerase Chain Reaction. *Zbl Bakt*, 285:480-485, 1997.
- 15 **Persing HD:** Polymerase Chain Reaction: Trenches to benches. *J Clin Microbiol*, 29: 1281-1285, 1991.
- 16 **Rodriguez JM:** Detection of pathogens by using the Polymerase Chain Reaction. *Vet J*, 153: 287-305, 1997.
- 17 **Saiki KR, Gelfand HD, Stoffi S, Scharf JS, Higuchi R, Horn TG:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988.
- 18 **Schochetman G, Jones KW:** Polymerase Chain Reaction. *J Inf Dis*, 158: 1154-1157, 1988.
- 19 **Sonie C, Watson k, Rybicki E, Luicio B:** Determination of the detection limit of the Polymerase Chain Reaction for chicken Infectious Anemia virus. *Avian Dis*, 37: 467-476, 1993.
- 20 **Starm YM, Meir R, Molad T, Blumenkranz R, Malkinson M:** Application of the Polymerase chain Reaction detect Infectious Bursal Disease virus naturally infected chickens. *Avian Dis*, 38: 879-884, 1994.
- 21 **Tindall RK, Kunkel AT:** Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA Polymerase. *Biochemistry*, 27: 6008-60013, 1988.
- 22 **Tunchili LM, Kodama H, Sharma RN, Takatori I, Pandey GS:** Detection of Salmonella DNA in chicken embriyos and environmental samples by Polymerase Chain Reaction. *J Vet Med Sci*, 58: 881-884, 1996.
- 23 **Walker J, Douan G:** DNA probes: A new role in diagnostic microbiology. *J Appl Microbiol*, 67: 229-230, 1989.
- 24 **Wolcott JM:** DNA - based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. *J Food Protec*, 54:387-401,1991.
- 25 **Wolcott JM:** Advances in nucleic acid - based detection methods. *Clin Microbil Rev*, 5: 370-386, 1992.