

Viral Hastalıkların Tanısında Laboratuvarın Önemi Muayene Maddesinin Alımı ve Ekimi

Emel Bozkaya

Klinik olarak virustan şüphelenilen hastalardan alınan muayene maddelerinden virusların direkt olarak izole edilmesini ve izole edilen virusların daha çabuk tanınmasını sağlayan yöntemler geliştikçe, hastalıkların tedavisinde laboratuvar bulgularının değeri daha fazla önem taşımaya başlamıştır.

Etkili antiviral maddelerin bulunması viral tanıya gidilmesinde önemli etkidir. Örneğin asiklovirin herpes simplex'te etkili olması, virusun çabuk ve özgül tanısının yapılmasında önemli etkidir. Böylece etken virusun tanısı, gereksiz yere zararlı olabilecek kemoterapötik ve antibiyotik kullanımı da önler. Ayrıca, örneğin aseptik meninjitte veya virusların neden olduğu bir meningoensefalitte etken virusun tanısının yapılması prognozda önem taşır.

Gebelik sırasında görülen viral infeksiyonların tanısı, örneğin hamileliğin başlangıcında kızamıkçık geçiren bir hastaya tam konması veya kızamıkçıklı bir çocukla temas etmiş bir hamile kadının bağışıklık durumunun saptanması; hamilelikte akut veya kronik hepatit B infeksiyonunun tanısı; doğuma yakın devredeki hamilelerde genital herpes simplex'in saptanması hastanın ve hastalığın yönlendirilmesinde büyük önem taşır.

Bağışıklık yetersizliği olan kişilerde herpesvirus infeksiyonlarının tedavisi, organ transplantasyonu yapılmış kişilerde ve kanı değiştirilmiş yenidoğanlarda sitomegalovirus infeksiyonlarının kontrolü de özgül viral tanıda önem taşır. Ayrıca, etkeni virus olan hastane infeksiyonlarına (HSV, RSV ve rotavirus infeksiyonu gibi) karşı önlem almada değer taşır.

Herpes simpleks virusu, sitomegalovirus, hepatit B virusu gibi cinsel temasla bulaşan viral infeksiyonların tanısı bunların yayılmasını önler. Halk sağlığı yönünden influenza, poliyomyelit, infeksiyöz hepatit ve diğer viral hepatitlerin tanısının yapılması, hastalıkların epidemiyolojik kontrolü için önemlidir.

Viral infeksiyonların laboratuvar tanıların yapılabilmesinin solunum ve sindirim sistemi ve karaciğer hastalıklarının göz ve perinatal hastalıkların etiyojilerinin belirlenmesinde önemli katkıların olmuştur. Ayrıca immün yetmezlik söz konusu olan hastalarda görülen bazı sendromları açıklamaya da yardımcı olmuştur.

Viral infeksiyonların laboratuvar tanısı üç ana yöntemle yapılabilir: (1) alınan muayene maddesinde doğrudan virus veya viral antijenin aranması; (2) virusun laboratuvarında çeşitli yöntemlerle izole edilip tanısının yapılması; (3) özgül viral antikorların saptanması esasına dayanan serolojik tanı.

Bu tanı yöntemlerinin biri ve birkaçı birlikte kullanılarak, hastalık tanısına gidilir. Bugün muayene maddesinde doğrudan virus veya viral antijenlerin aranmasını esas alan çabuk tanı yöntemleri, üzerinde en çok çalışılan yöntemlerdir.

Ancak tüm tanı yöntemlerinde başarılı olabilmek için hastalığın hangi devrinde, hangi muayene maddesinin alınması gerektiğinin iyi bilinmesi gerekir (Tablo 1).

Tablo 1. Hastalığın Devresine Göre Virus Bulunma ve Antikor Saptanma Olasılığı

Hastalık Devresi	Virus Saptanma Olasılığı	Antikor Saptanma Olasılığı *
İnkübasyon	Nadiren	Yok
Prodrom	Arasına	Yok
Başlangıç	Sıklıkla	Ara sıra
Akut faz	Sıklıkla	Sıklıkla
İyileşme	Nadiren	Umumiyetle
Konvelasan	Çok nadir	Umumiyetle

* Önceden aşılanaalarda antikor çok erken teşekkül eder.

Uygun muayene maddesinin seçimi, aynı organda çeşitli viruslar etken olabileceğinden komplike olabilir. Hastalık etkeni virusun izolasyonu için, birden fazla muayene maddesi gerekebilir. Örneğin merkezi sinir sistemi hastalıklarında, çeşitli muayene maddeleri alınabilir. Beyin-omurilik sıvısında (BOS) enterovirus, kabakulak virusu, herpes simpleks virusu; boğazda enterovirus, herpes simpleks virusu; idrarda kabakulak virusu; dışkıda enteroviruslar saptanabilir.

Bunlara ilaveten hastalığın akut devrinde kan alınarak serolojik tanı için bekletilir. Ayrıca uygun muayene maddesinin saptanmasında klinik hekiminin uyarılarını dikkate almak gerekir. Örneğin yaz aylarında enteroviral menenjitlerin prevalan olduğu devrelerde boğaz, dışkı örneği ve beyin-omurilik sıvısı alınmalıdır. Diğer taraftan çocukta ensefalit görüldüğünde, ormanlık bölgede sivrisinek ısırıkları söz konusu olduğunda arbovirus infeksiyonları düşünülmelidir. Bunun için de kültür ve antikor saptama için kan alınmalıdır. Merkezi sinir sistemi infeksiyonları bazı hastalıklar sonucunda oluşabilir. Parotis iltihaplanmasını müteakip oluşmuşsa, muayene maddesi olarak idrar ve BOS alınır. Bu klinik verilerle muayene maddesi klinik tarafından yönlendirilmeli ve muayene maddesi, infeksiyonun başlangıcında alınmalıdır.

Muayene Maddesinin Alınması

Solunum yolları infeksiyonlarında muayene maddesi olarak; boğaz salgısı, nazofarinks salgısı veya boğaz çalkantı suyu alınır. Virus elde edilmesinde nazofarinks yıkantı suyu, virus izolasyonu yönünden eküvyonla alınan muayene maddelerinden daha elverişlidir. Ancak eküvyonla boğaz salgısı alınması, daha yaygın kullanılmaktadır. Boğaz salgısı enterovirus, adenovirus ve herpes simpleks virusu izolasyonunda; nazofarinks salgısı, solunum sinsisyal virusu, influenza ve parainfluenza viruslarında; nazal muayene maddeleri, rinovirusların elde edilmesinde elverişlidir (Tablo 2).

Gastrointestinal infeksiyonlarda muayene maddesi olarak, rektal sürüntü ve dışkı alınır. Yapılan araştırmalar, dışkıdan virus izolasyonunun veya tanısının rektal sürüntüye oranla, daha elverişli olduğunu göstermektedir. Viral gastroenterit-

Tablo 2. Solunum Yollarında İnfeksiyon Oluşturan Viruslar, Alınacak Muayene Maddeleri

Adenovirus:	BÇS*		+ Serolojik tanı
Enterovirus:	BÇS		-
Herpes simpleks virüsü:	BÇS		+ Serolojik tanı
Influenza virüsü:	BÇS		+ Serolojik tanı
Kabakulak virüsü:	BÇS	+ İdrar	+ Serolojik tanı
Parainfluenza virüsü:	BÇS		+ Serolojik tanı
Solunum sinsiyal virüsü:	BÇS	+ NA**	+ Serolojik tanı
Rinovirus:	BÇS	+ NS***	+ Serolojik tanı

* BÇS: Boğaz çalkantı suyu; ** NA: nazofariengeal aspirat;
*** NS: Nazal sekresyon

Tablo 3. Gastrointestinal İnfeksiyon Oluşturan Viruslar, Alınacak Muayene Maddeleri

Adenovirus	Dışkı/Rektal sürüntü + Serolojik tanı
Parvovirus (Norwalk benzeri etkenler)	Parvo-ve rotavirusların kültürü yapılamaz; elektron mikroskopu ile veya immünolojik yöntemlerle tanıya gidilir.

lerde etken olan virusların hücre kültürlerinde üremedikleri bugün bilinmektedir. Böyle vakalarda, dışkı örnekleri elektron mikroskopu ile veya direkt antijen aranması için kullanılan yöntemlerle incelenmelidir (rotavirus, Norwalk benzeri etkenler ve muhtemelen bazı adenoviruslar için). Dışkı kültürleri enterovirusların neden oldukları hastalıklarda faydalı olur. Örneğin, aseptik menenjit, miyoperikardit hastalığında, hastaların dışkısında enteroviruslar izole edilirse de, bu etkenlerin hastalığın esas nedeni olup olmadıkları kesin bilinmemektedir. Herpes simpleks virüsü, sitomegalovirus gibi genellikle etrafı lipid membran ile örtülü olan viruslarda, virusların infektivitesi midede gastrik asit ile harap olur, bundan dolayı dışkıdan aktif şekilde atılmazlar (Tablo 3).

İdrardan izole edilebilen viruslar arasında kabakulak, adenovirus, sitomegalovirusu sayabiliriz. Kabakulak virüsü merkezi sinir sistemi infeksiyonlarında diğer muayene maddelerinden izole edilemediğinde idrarda aranmalıdır. Sitomegalovirusun idrardan izole edilme şansı, diğer muayene maddelerine oranla daha fazladır. Sitomegalovirus izolasyonu için idrarın doku kültürüne direkt olarak ekilmesi önerilir. Ayrıca idrar santrifüj edilip, hem santrifüj üst sıvısından hem de çöküntü az miktarda besiyeri ile sulandırılarak ekim yapılabilir. Sitomegalovirus izolasyonu için idrar en uygun muayene maddesi ise de, bazı hastaların boğaz salgılarından da izole edilebilir (Tablo 4). Genellikle idrar sedimentinde sitomega-

Tablo 4. İdrardan İzole Edilen Viruslar, Alınacak Muayene Maddeleri

Adenovirus	: İdrar + Serolojik tanı
CMV	: İdrar + Serolojik tanı

lik inklüzyon cisimi taşıyan hücrelerin aranması duyarlı bir yöntem değildir, virus izolasyonunun çocuk ve yetişkinler için dört kez daha duyarlı olduğu bildirilmektedir.

Deri lezyonlarından alınan vezikül sıvısı veya hücreler virus kültürünün yapılması veya boyanarak incelenmesi için uygun muayene maddeleridir. Muayene maddesi eküvyonla veya vezikül sıvısı ince uçlu Pasteur pipeti ile alınıp pipetin her iki ucu alevde kapatılarak, laboratuvara gönderilir (Tablo 5).

Merkez sinir sistemi steril sıvıları, plevra, periton ve perikart sıvılarının steril şartlarda alınıp, alınır alınmaz doku kültürlerine ekimleri gereklidir (Tablo 6).

Göz infeksiyonlarında göz yıkantı suyu, nazofarinks sürüntüsü, palpebral konjunktiva sekresyonları virusların elde edilmesinde kullanılabilir. Gözden muayene maddesi alınımın bir oftalmolog veya bu konuda yetişmiş personel tarafından yapılması uygun olur (Tablo 7).

Bağışıklığı baskılanmamış hastalarda sitomegalovirus ile

Tablo 5. Döküntülü Hastalıklara Neden Olan Viruslar ve Bunlarla Oluşan İnfeksiyonlarda Alınacak Muayene Maddeleri**Makülopapüler Döküntüler**

Adenovirus	BÇS*	+ Dışkı/Rektal sür.	+ ST**
Enterovirus	BÇS	+ Dışkı/Rektal sür.	-
Kızamıkçık virüsü	BÇS	+ İdrar	+ ST
Kızamık virüsü	BÇS		+ ST

Veziküler Döküntüler

Koksaki A virüsü	BÇS	+ Dışkı/Rektal sür.	+ VS***
Ekovirus	BÇS	+ Dışkı/Rektal sür.	+ VS
HSV	VS	+ ST	
Vaksinya ve diğer poksiviruslar	VS		

* BÇS: Boğaz çalkantı suyu; ** ST: Serolojik tanı;
*** VS: Vezikül sıvısı

Tablo 6. Merkezi Sinir Sistemi İnfeksiyonlarına Neden Olan Viruslar ve Bunlarla Oluşan İnfeksiyonlarda Alınacak Muayene Maddeleri

Arbovirus	: Kan+Serolojik tanı
Enterovirus	: Boğaz+Dışkı/Rektal sürüntü+BOS
HSV	: Vezikül sıvısı+BOS+Beyinden biyopsi+Serolojik tanı
Kabakulak	: Boğaz çalkantı suyu+BOS+İdrar+Serolojik tanı
Kuduz	: Kan+Serolojik tanı+Biyopsi materyelinden floresan antikor

Tablo 7. Gözde İnfeksiyon Oluşturan Viruslar, Alınacak Muayene Maddeleri

Adenovirus	: Boğaz çalkantı suyu+Göz salgısı+Serolojik tanı
Enterovirus	: Boğaz çalkantı suyu+Göz salgısı -
HSV	: Boğaz çalkantı suyu+Göz salgısı+Serolojik tanı

oluşan viremi infeksiyonun akut devresinde meydana gelir ve kemik iliği nakli yapılan hastalarda letal pnömونيye neden olabilir. Virusların yerleştiği lökositler "F coli-Hypaque-Macrodex" tekniği ile "buffy coat" yöntemine oranla daha iyi elde edilebilirler. Arbovirusların izolasyonunda da pıhtılaşmamış kan veya kan pıhtısı kullanılır (Tablo 8).

Hepatit nedeni olan viruslar, genital infeksiyona neden olan viruslar, konjenital ve perinatal infeksiyonlara neden olan viruslar, infeksiyöz mononükleoz nedeni olan viruslar, kalpte infeksiyon nedeni olan viruslar ve alınacak muayene maddeleri Tablo 9'da belirtilmiştir.

Muayene Maddesinin Hazırlanması

Laboratuvara virus izolasyonu için gelen muayene madde-

Tablo 8. İmmun Yetmezlikte İnfeksiyon Yapan Viruslar*

CMV : Boğaz çalkantı suyu+İdrar+Kan+Serolojik tanı
EBV(nadiren): Serolojik tanı

* İmmun yetmezliği olanlarda adeno-ve enteroviruslar gibi viruslar da hastalık yapabilir.

Tablo 9. İnfeksiyon Etkeni Olan Diğer Viruslar ve Alınacak Muayene Maddeleri

Hepatit Nedeni Olan Viruslar

CMV	Boğaz çalkantı suyu+İdrar+Serolojik tanı
EBV	Serolojik tanı
Hepatit A, B non A-nonB	Karaciğer biyopsisi+Serolojik tanı

Genital İnfeksiyonlara Neden Olan Viruslar

HSV	Vezikül sıvısı+Endoservikal sürüntü+Serolojik tanı
-----	--

Konjenital ve Perinatal İnfeksiyonlara Neden Olan Viruslar

Sitomegalovirus	Boğaz çalkantı suyu+İdrar+Kan (lökosit)+Serolojik tanı
Enterovirus	Boğaz çalkantı suyu+Dışkı/Rektal sürüntü+BOS+Kan
HSV	Boğaz çalkantı suyu+BOS+Vezikül sıvısı+Kan+Serolojik tanı
Kızamıkçık	Boğaz çalkantı suyu+İdrar+Serolojik tanı

İnfeksiyöz Mononükleoz Nedeni Olan Viruslar

CMV	Boğaz çalkantı suyu+İdrar+Kan (lökosit)+Serolojik tanı
EBV	Serolojik tanı

Kalpte İnfeksiyona Neden Olan Viruslar

Koksaki B virusu	Boğaz çalkantı suyu+Dışkı/Rektal sürüntü+Perikard sıvısı
CMV	Boğaz çalkantı suyu+İdrar+Perikard sıvısı+Serolojik tanı
Influenza A, B virusu	Boğaz çalkantı suyu+Serolojik tanı

lerini normal flora içermeyen muayene maddeleri ve normal flora içerenler olmak üzere iki grupta toplamak mümkündür.

Bakteri florası içermeyen beyin-omurilik sıvısı, serum, kan, plazma gibi örnekler herhangi bir ön muamele yapılmaksızın duyarlı konaklara (embriyonlu yumurta, doku kültürü veya deney hayvanı) ekilirler. Beyin ve diğer dokular gibi maddeler ise, önce süspansiyon haline getirilirler. Bunun için doku parçası önce steril pens ve makas yardımı ile parçalara bölünür, steril bir havanda biraz kumla ezilir, homojen bir yapı aldığında tamponlu bir tuz çözeltisi ile sulandırılarak % 10-20'lik süspansiyonu yapılır; 1000-2000 devirde 5 dakika santrifüj edilir; üst sıvı izolasyon için kullanılır. Bir başka yöntem ise doku veya organ parçalarını tripsinizasyonla hücrelerine ayırdıktan sonra bu hücre süspansiyonuna gelişme besiyeri ilave ederek tek tabakalı hücre kültürü hazırlanmasıdır. Burada hücreler ve üretilmek istenen virus birlikte ürerler. Bir diğer şekilde tripsinizasyonla ayrılan hücreler bir başka doku kültürüne ilave edilir; buna birlikte kültür (co-cultivation) denir.

Muayene maddesi normalde bakteri florası içeriyor ise, bu muayene maddelerine ekim öncesi işlem uygulanır. Bu amaçla bakterisit maddeler, mekanik ve fiziksel yöntemler kullanılır. Bakterisit etkenlerden en yaygın kullanılanı eter ve antibiyotiklerdir. Eterle bakterilerin inaktive edilmesi etere duyarlı olmayan viruslarla ilgili muayene maddeleri için uygundur. Bunun için muayene maddesi % 10-15 oranında eterle karıştırılır, bir süre beklenir ve ekim yapılır. Antibiyotikler viruslara etkisiz olduklarından muayene maddelerinin bakterilerden arıtılmasında çok kullanılırlar. Özellikle penisilin-streptomisin kombinasyonu yaygın kullanılmaktadır. Gerekliğinde mantarlara etkili antibiyotikler de kullanılır. Bakterilerden arıdırmada fotodinamik inaktivasyon da kullanılabilir. Mekanik yöntem olarak filtrasyon ve santrifüj uygulanır. Bugün birçok virus laboratuvarında, bakterisit maddelerle mekanik yöntemler birlikte uygulanmaktadır.

Genellikle flora içeren muayene maddesi önce santrifüj edilir, böylece kaba parçacıklar ve bakteriler bir bölümü çöktürüldükten sonra üst sıvıya uygun oranda antibiyotikler karıştırılıp, muayene maddesi duyarlı olduğu konağa ekilir.

Alınan doku parçasının tripsin ile hücrelerine ayırdıktan sonra kültürlerin hazırlanması dokudan virus izolasyonunda kullanılan yöntemdir. Ancak viral inhibitörlerin bulunması parçalanmış hücrelerde virus izolasyonunu güçleştirebilir. Akciğerden (CMV, influenza virusu, adenovirus) ve beyinde, (HSV) virus izolasyonlarında bu yöntem çok başarılı olmaktadır.

Muayene Maddesinin Nakli

Eküvyonla alınan muayene maddelerinden olduğu gibi bazı örneklerin besiyeri içine alınması, etken virusun devamlılığı için uygun olur. Bu amaçla, çeşitli besiyerleri kullanılabilir. Burada ya laboratuvarında kullanılmakta olan besiyeri veya üremesi düşünülen virus suşunun özellikleri gözönüne alınarak seçim yapılır. Üst solunum yollarından ve çocuklardaki deri lezyonlarından alınan muayene maddeler modifiye Stuart, modifiye Hanks veya Leibovitz-Emory besiyerlerine alınır. Bu beyerlerinin yapıları bakımından aralarında anlamlı bir farklılık bulunmaz. Genellikle transport besiyerinde protein (serum, albumin, jelatin) bulunmasının bu geçici dönemde virusların canlı kalmaları açısından gerekli olduğu düşünülmektedir.

Alınan muayene maddelerinin konduğu kabın kalın kenarlı, lastik upalı veya burgulu kapaklı olması gerekir. Ayrıca bu kapların nakil esnasında kırılmaması için kalın karton

plastik veya tahta kutular içinde gönderilmesi emniyetlidir.

Muayene Maddesinin Saklanması

Hastadan alınan muayene maddesi hemen konak hücre sistemine etkilemiyor ve bir süre bekletilmesi gerekiyor ise, mutlaka soğukta bekletilir. Oda ısısında virüsler infektivitelerine kaybederler. Kısa süreli bekletilmeler için 4°C buzdolabı kullanılır. Ancak uzun süreli bekletilmeler için mutlaka derin dondurucularda saklanmaları gerekir. Burada gözönünde tutulması gereken nokta, etken virüsün yapısıdır. Çünkü lipid kılıf ile çevrili virüsler dondurulup eritilme işleminden etkilenirler. Çıplak virüsler ise, sadece protein ile çevrili olduklarından etkilenmezler. Örneğin, RSV içeren bir muayene maddesi -20°C'de 1-3 gün muhafaza edildikten sonra eritildiğinde, virus titresinde 10² veya daha fazla azalma saptanır. Halbuki muayene maddesi, 1-3 gün Hanks veya diğer bir besiyeri içinde 4°C'de bekletilirse, muayene maddelerinin üçte ikisinde infektivite kaybı olmaz. Yapılan bir çalışmada, sitomegalovirus içeren bir muayene maddesi 7 gün 4°C'de bekletildiğinde % 7 oranında sitopatik etki gösterebildiği de bildirilmektedir. Alternatif olarak, bazı muayene maddeleri laboratuvara geldiğinde sorbitol gibi bir koruyucu madde ilave edilir ve daha sonra virus süspansiyonu dondurulup çözülür. Dondurma işleminin -70°C'de ve çözme işleminin 25°C'de yapılması uygun olur.

Sonuç olarak 3-5 gün gibi kısa süreli bekletme işleminde virus süspansiyonlarının 4°C'de bekletilmesi, dondurularak bekletilmesinden daha uygun olur.

Liyofilizasyon: Bu işlem yüksek derecedeki vakumda numunelerin donmuş durumda iken hızla kurutulması esasına dayanır. Numuneler aynı anda vakum altında kapatılırlar. Liyofilize virus buzdolabında saklanır.

Gliserin'de saklama: En eski ve en basit usuldür. Muayene maddeleri (küçük doku parçaları, dışkı numunesi, müküs süspansiyonları) % 50'lik gliserinde karıştırılarak saklanabilir. Patojen bakteriler gliserin içinde 5-6 günde ölürler.

Muayene Maddesinin Ekimi

Muayene maddeleri tam tabaka yapılmış, çoğunlukla tüplerdeki hücre kültürlerine ekilirler. Tüpler çok miktarda inokülasyon imkanı, az yer kaplamaları, az besiyeri ile çalışma ve mikroskopta inceleme kolaylıklarından dolayı tercih edilirler. Tam tabaka teşkil etmiş tüplerde, yaklaşık 100.000 hücre vardır ve virus ekildiğinde yaklaşık 10⁸ virus partikülü meydana gelebilir. Tüplerde tam tabaka halinde hücre kültürleri meydana geldiğinde tüpler kullanılmaya hazırdır. Tüplere muayene maddesi ekilmeden önce tüplerde bulunan gelişme besiyeri dökülür, Yerine muhafaza besiyeri konulur. Şayet se-

rumuz muhafaza besiyeri konulacaksa, 2 defa 1-2 ml muhafaza besiyeri konulup, hücreler üzerinde gezdirilip dökülmek suretiyle yıkanır. Tüpe tekrar aynı miktar muhafaza besiyeri konulur. Kültür pH'sının çok yüksek olmaması için en iyisi besiyeri değiştirme bir gün önce yapılmalıdır. pH normal olmayan asit veya alkalen olan tüpler atılırlar. Aynı zamanda ekim yapılmadan önce bütün tüpler mikroskopta kontrol edilir.

Daha önce alınıp, ekim için hazırlanmış muayene maddesinde her tüp için 0.2 ml miktarda muayene maddesi ekilir. Her muayene maddesinden birkaç tüpe ekim yapılır ve her seri için birkaç tüp kontrol olarak bırakılır. Kontrol tüplere ekim yapılmaz. Ertesi gün ve bunu takip eden günlerde tüpler mikroskop altında muayene edilirler. Kontrol tüplerinde tam tabakalı hücre tabakası olması yapılan işlemin kontrolü yönünden gereklidir. Muayene maddesi ekilmiş doku kültürlerinde virus identifikasyonu en pratik olarak şayet virus enterovirus, adenovirus, herpesvirus gibi sitopatik etki yapan bir virus ise kolayca tanınabilir.

Elektron mikroskopunda incelenerek, hemaglutinasyon ve hemadsorpsiyon ile, bağışık serumlarla nötralizasyon yapılarak, idantifiye edilebilir.

Kaynaklar

1. Chernesky MA, Ray CG, Smith TF. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. Cumitech 15. Washington: American Society for Microbiology, 1987.
2. Drew WL, Stevens GR. How your laboratory should perform viral studies laboratory equipment, specimen types, cell culture techniques. *Lab Med* 1979; 10: 741
3. Huntoon CJ, House RF, Smith TF. Recovery of viruses from three transport media incorporated into cultures. *Arch Pathol Lab Med* 1979; 105: 436.
4. Lennette DA, Lennette ET *A User's Guide to the Diagnostic Virology Laboratory*. Baltimore: University Park Press, 1987.
5. Lennette EH, Schmidt NJ. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections* 5th ed. New York: American Public Health Association, 1979.
6. Madeley CR, Lennette DA, Halonen P. Specimen collection and transport. In: Lennette EH, Halonen P, Murphy FA: *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Principles and Practice. Vol II. Viral, Rickettsial and Chlamydial Diseases*. New York: Springer Verlag 1988: 1-11.
7. Smith TF. Viruses. In: Washington JA ed. *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. 2nd ed. Springer Verlag 1979: 525-608.
8. Signo S, Pass RF, Reynolds DW, Moore MA, Nahmias AJ, Alford CA. Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1980; 65: 251.
9. Yeager AS, Morris JE, Prober CG. Storage and transport of cultures for herpes simplex virus type 2. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 977.