



PCR İnhibitörleri: Kaynakları, İnhibisyon Mekanizmaları ve Kontrol

PCR Inhibitors: Sources, Inhibition Mechanisms and Control

İsmail Selçuk AYGAR¹ [ID], Muhammed Furkan KÜRKÇÜ¹ [ID], Selman KIZIL¹ [ID]

¹Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 02.05.2020. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 05.07.2020.

İletişim [Correspondence]: İsmail Selçuk AYGAR; Uzm.Dr., Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. E-posta: drisa1986@hotmail.com [İsmail Selçuk AYGAR; MD, Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey. E-mail: drisa1986@hotmail.com]

Özet

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) temelli testlerin ilk örnekleri ve denemeleri üzerinden 40 yıla yakın bir zaman geçti. Bu süreçte PCR temelli moleküler testler gıda güvenliği, adli incelemeler, çevresel örneklerin incelenmesi, rekombinan gen teknolojisi, insan-hayvan-bitki-mikroorganizma genetiği ve immünoloji gibi alanlarda yaygın olarak kullanıldığı gibi en önemli kullanım alanlarından biri de enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve takibi olmuştur. 2020 yılının ilk aylarından itibaren tüm dünyayı etkisi altına alan SARS-CoV-2 pandemisi ile mücadelede ülkelerin günlük test kapasiteleri ön plana çıkmış ve bu kapasitenin bazı ülkelerin salgın yönetimindeki başarısı üzerinde önemli etkileri olduğu üzerinde durulmuştur. Bu süreçte kısa bir zaman içerisinde çok sayıda kullanıcı tasarımı (in-house) ve ticari SARS-CoV-2 RNA testi dizayn edilirken, PCR temelli tanı testleri belki de tarihte hiç olmadığı kadar yoğun bir şekilde kullanılmıştır. Türkiye'nin de dahil olduğu gelişmiş sağlık altyapısına sahip birçok ülkede bu testlerin kullanım onayı, tedarik ve pazarlama süreçleri sıkı denetimlere tabi tutulmuştur. Bu makalede çevresel (kanalizasyon suları, çevresel yüzeyler, hava örneklemeleri ve gıdalar) ve biyolojik örneklerde (hayvan örnekleri, hücre kültürleri, insanlardan alınan kan, solunum yolu, idrar, doku ve dışkı örnekleri gibi klinik örnekler) yapılan PCR testleri için önemli bir problem olan ve yanlış negatif sonuçların önemli bir nedeni olan inhibitör maddelere dikkat çekmek amaçlanmıştır. Makalede ayrıca inhibitör maddelerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için geliştirilen çeşitli önlemler ve inhibisyon kontrolünün önemi üzerinde durulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Amplifikasyon, Floresan, Moleküler tanı, DNA polimeraz.

Abstract

Nearly 40 years have passed since the first trials and prototypes of Polymerase Chain Reaction (PCR) based tests. In this period, PCR-based molecular tests have been widely used in the fields of food safety, forensic examinations, examination of environmental samples, recombinant gene technology, human-animal-plant-microorganism genetics, and immunology, as well as in diagnosis and monitoring of infectious diseases. In the fight against the SARS-CoV-2 pandemic, which has globally impacted the world since the first months of 2020, countries' daily testing capacities have gained importance and it was emphasized that this capacity had important effects on the success of some countries in epidemic management. In this process, while many in-house and commercial SARS-CoV-2 RNA tests were designed in a short time, PCR based diagnostic tests were used more extensively than ever before. The usage approval, procurement and marketing processes of these tests have been subjected to strict inspections in many countries, including Turkey, with advanced health infrastructure. In this article we aimed to draw attention to inhibitory substances that are a major cause of

false negative results in PCR assays carried out in environmental (sewage waters, environmental surfaces, air samples and foods) and biological samples (clinical samples such as animal samples, cell cultures, blood samples from human, respiratory tract, urine, tissue and feces) in this article. The article also focused on various measures taken to eliminate the negative effects of inhibitory substances and the importance of inhibition control.

Keywords: Amplification, Fluorescent, Molecular diagnosis, DNA polymerase.

Giriş

Bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonların tanısı ve izleminde, genetik hastalık tanısında, epidemiyolojik ve çevresel araştırmalarda, adli tıp incelemeleri ve biyoterörizm alanlarında, gıda mikrobiyolojisi ve güvenliğinde, tarımsal ve veterinerlik uygulamalarında, moleküler klonlama ve gen ekspresyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri bilim dünyasına büyük avantajlar ve uygulama kolaylıkları getirmiştir. Bununla beraber çeşitli inhibitör etkiler PCR'ın bu yararlılığını sınırlamaktadır [1]. Amplifikasyonu inhibe eden faktörlerin varlığında, başta testin saptama duyarlılığı olmak üzere, PCR performansı doğrudan etkilenmekte ve reaksiyon verimliliği düşmektedir [1]. Bu inhibitör etkiler aynı zamanda PCR çalışmalarında yanlış negatif test sonuçlarının en önemli nedenlerinden biridir [2].

PCR inhibisyonu, iyi kontrol edilmemiş reaksiyon koşullarından veya inhibitör maddelerin varlığından kaynaklanabilir. Numune matrisinden ve hedef hücrelerden veya numune hazırlanması sırasında eklenen reaktiflerden gelen ve in vitro DNA polimerizasyonunu veya floresan sinyalini etkileyen moleküller PCR inhibitörleri olarak adlandırılır [3]. Farklı PCR protokolleri için çok sayıda farklı inhibitör etki mekanizması tanımlanmış ve bu inhibitör etkileri ortadan kaldırmak için çeşitli uygulama ve yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu makalede, reaksiyon karışımında bulunduğu PCR'ı inhibe eden maddeler ve inhibisyon mekanizmaları ile bu maddelerin inhibitör etkilerini ortadan kaldırmak için başvurulan temel uygulamalara değinilmiştir.

Bilinen PCR İnhibitörleri ve Kaynakları

Çalışılan örnekten veya PCR öncesi hazırlıkta kullanılan maddelerden orijin alabilen PCR inhibitörleri amplifikasyonun etkinliği azaltmak veya tamamen engellemek suretiyle PCR sonuçlarını doğrudan etkileyebilirler. Biyolojik

örneklerin birçoğunun; içerdiği kompleks biyolojik yapılar nedeniyle PCR reaksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla beraber, PCR inhibitörlerinin az bir kısmı tanımlanabilmiş ve bazı bileşikler çeşitli çalışmalarda (hatta aynı sistem içinde) hem inhibitör hem de kolaylaştırıcı olarak rapor edilebilmektedir. Örneğin, bazı çalışmalarda spermidinin inhibitörleri çökeltmek amplifikasyonu kolaylaştırdığı rapor edilmişken, bazı araştırmacılar ise poliaminlerin (spermin ve spermidin) PCR verimliliği ve özgünlüğü üzerine konsantrasyon-bağımlı bir etkisi olduğunu bildirmiştir. Bilinen PCR inhibitörlerinin bir bölümü **Tablo 1**'de listelenmiştir. İnhibitör maddeler reaksiyon bileşenleri de dahil olmak üzere endojen (örneğin; numune, enzim ve tüpler) veya eksojen (örneğin, bakteri, toz ve polen) kaynaklı olabilirler. Örneğin, ticari *Taq* polimeraz preparatlarının içerdikleri düşük-seviye-DNA ürünleri de dahil olmak üzere, *Escherichia coli* ve *Thermus aquaticus* dışı öbakteriyel DNA ile kontamine olabildiği gösterilmiştir. Bu kontaminasyon nedeniyle oluşan yanlış pozitif reaksiyonlar, broad-range öbakteriyel primerler ile gerçekleştirilen PCR'in etkinliğini azaltabilir. Daha spesifik hedeflerin seçilmesiyle bu problem önemini yitirebilir. İyi laboratuvar uygulamaları ve aseptik tekniğin titizlikle uygulanması inhibitör kontaminasyonunu önlediği gibi hedef dizilerin çapraz bulaşının önüne geçilmesine de olanak sağlar. Laminer-flow kabinlerin kullanımı hava kontaminasyonunu önlemede yararlı olabilir ve kontaminasyonu en aza indirmek için UV ışık kaynağı ile donatılmış özel kabinler kullanılabilir [1,2,4,5].

Nükleik asit saflaştırılması için kromatografik prosedürlerin kullanıldığı çalışmalarla kandaki hemoglobin, IgG ve laktoferrin en önemli üç inhibitör olarak tanımlanmıştır [6,7]. IgG'nin tek zincirli DNA ile etkileşerek inhibitör etki gösterdiği

bulunmuştur [3]. Bu etkileşim kan örneklerinin ısıtılmasıyla önlenemez, ancak kaynatma yoluyla ön hazırlık yapılabilecek koşulların bulunmadığı laboratuvarlarda hot-start PCR metodu bu inhibisyonu önlemek için yeterli olmaktadır. Hemogloblin ve laktoferrin ise PCR karışımı içerisinde serbest demir iyonları bırakmaları nedeniyle inhibitör etki gösteren, eritrosit ve lökositlerde bulunan major inhibitörlerdir. Serbest demirin DNA sentezini engellediği bilinmektedir. Bilirübin, safra tuzları ve hemin gibi hemogloblin

yan ürünlerinin de PCR inhibitörü olduğu gösterilmiştir [1]. Kan varlığı farklı DNA polimerazları farklı düzeylerde etkilemektedir. Dokuz termostabil DNA polimeraz için kanın inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada AmpliTaq Gold ve Taq DNA polimeraz enzimleri PCR karışımında 0.004% oranında kan varlığında tamamen inhibe olurken, HotTub, Pwo, rTth, ve Tfl DNA polimeraz enzimleri %20 kan varlığında bile reaksiyon sensitivitesinde azalmaya neden olmadan DNA'yı amplifiye edebilmişlerdir [8].

Tablo 1. Bilinen PCR inhibitörleri ve kaynakları.

İnhibitör kaynağı	İnhibitör maddeler	
Örnek içeriği	Feçes	Safra tuzları (kolik ve deoksikolik asit), kompleks polisakkaritler, selüloz, bilirübin
	Balgam	Kompleks polisakkaritler
	BOS	Hücrel yıkım ürünleri
	Semen	Spermin ve spermidin
	Dokular ve kemik	Kollajen, DNA bağlayıcı proteinler
	Toprak, çevresel örnekler	Humik asit (fenolik içerikler), ağır metaller
	Bitkisel materyaller	Kompleks polisakkaritler, humik asit, tannik ve fulvik asit
	Saç ve deri	Melanin ve ömelanin
	Kas dokusu	Miyogloblin
	Bitkiler	Polisakkaritler
	Süt ve süt ürünleri	Proteinazlar (plazmin), Ca ⁺⁺ , termonükleaz, proteinler, bakteriyel debris
	Kemik	Kalsiyum iyonları
	Gıdalar	Organik ve fenolik içerikler, glikojen, yağlar, Ca ⁺⁺
	İdrar	Üre
	Kan	Hem, hemogloblin, laktoferrin, IgG, DNA bağlayıcı proteinler
	Su	Formaldehit, potasyum dikromat, sellüloz ve nitrosellüloz filtreler, Humik-benzeri maddeler
	Kumaş	İndigo boyası
Diğer	Antibiyotikler	
Örnek alımı veya işlenmesi sırasında veya PCR öncesi hazırlıkta kullanılan materyaller	Alüminyum saplı svaplar	Al ⁺³
	Kalsiyum aljinatlı svaplar	Alginate, Ca ⁺⁺
	Kan alma tüplerindeki antikoagulan maddeler	Heparin, EDTA
	PCR tüplerinin UV ile muamelesi	Polimeraz ile etkileşime giren serbest radikaller
	Saptayıcı boyalar	SYBR Green I, SYTOX Orange, TO-PRO-3
	DNA ekstraksiyonu	KAc/K ₂ Cr ₂ O ₇ (iyon kompozisyonunu bozar), NaOH, NH ₄ Ac, fenol, etanol, etidyum bromid, izopropanol, PEG,
	Koruyucu	KAc/K ₂ Cr ₂ O ₇ , formaldehit
	Çoğaltma medyumları	LiCl, MgCl ₂
	Polimerik yüzeyler	Minyatürize real-time PCR cihazlarında SYBR Green gibi boyaları bağlayabilirler.
	Su	Formaldehit, potasyum dikromat, sellüloz ve nitrosellüloz filtreler, Humik-benzeri maddeler
	Kumaş	İndigo boyası
Diğer	Antibiyotikler, NaCl	
İnhibitör madde ile kontaminasyon	Reaksiyon tüpü	Dnaz, Rnaz, Proteaz
	Laboratuvar malzemeleri	Eldiven pudrası, plastik laboratuvar malzemeleri, polen, sellüloz ve nitrosellüloz filtreler
	Hücrel kontaminasyon	Bakteriyel hücreler, hedeflenmeyen DNA

[1,3,5,9-20].

PCR İnhibitörlerinin Etki Mekanizmaları

PCR inhibitörlerinin etkileri, reaksiyon karışımındaki saf DNA konsantrasyonu arttırılarak veya inhibitör etkisi olduğu düşünülen maddelerin farklı konsantrasyonları reaksiyon karışımına eklenerek, ya da her iki yöntem beraber kullanılarak belirlenebilir. Isı döngü (*thermal-cycler*) cihazları ile yapılan gerçek zamanlı (*real-time*) analizler sayesinde inhibitörlerin kantitatif etkileri de değerlendirilebilmektedir. PCR inhibitörlerinin özellikleri, inhibisyon kapasiteleri ve etki mekanizmaları ile ilgili detaylı bilgiler, bu inhibitör etkileri ortadan kaldırmak için örnek hazırlama basamaklarında neler yapmamız gerektiği konusunda önem taşımaktadır. Çoğu PCR inhibitörünün hangi mekanizmalarla etki ettiği henüz açık olarak bilinmemektedir. Ancak, PCR inhibitörlerinin genel olarak; termostabil DNA polimeraz aktivitesinin inhibisyonu, nükleik asitleri yakalama-tutma veya parçalama, DNA ekstraksiyonu için gerekli olan hücre lizisinin engellenmesi, reaksiyon komponentlerinden birinin engellenmesi ve real-time PCR'da floresans inhibisyonu mekanizmalarından bir veya daha fazlası ile etki gösterdiği belirlenmiştir [1,5,21].

1. DNA Polimeraz inhibisyonu

İnhibitörler reaksiyonun bir veya daha fazla basamağını etkileyebilirler, ancak en önemli etki polimeraz aktivitesinin inhibisyonu şeklindedir ve bu nedenle amplifikasyon süresince polimerazlar DNA sentezi ve inhibitörlere direnç açısından anahtar fonksiyona sahiptir. Termostabil DNA polimerazlar biyolojik örneklerdeki çeşitli komponentlere göre çok çeşitli performanslar ortaya koyarlar ve çok farklı özellikler taşırlar. Bazı DNA polimerazlar, örneğin *Taq* DNA polimeraz; klinik, çevresel ve gıda örnekleri (kan, peynir, dışkı ve et gibi) de dahil olmak üzere birçok biyolojik numune ve çeşitli iyonlar ile inhibisyona duyarlıdır [1,2]. Günümüzde DNA polimerazlar ve inhibisyon özellikleri dikkate alınarak farklı oranlarda inhibitör içeren örnekler için özel polimerazlar tasarlanmış ve bu enzimler ticari olarak kullanıma sunulmuştur. Numune matrisi ile uyumlu bir DNA polimeraz ve tampon sistemi tasarlamak için, farklı moleküllerin polimerizasyonu nasıl etkilediğini anlamak bu nedenle büyük önem taşımaktadır [3].

Farklı biyolojik örnekler için uygun DNA polimerazların seçilmesi ile PCR öncesi uzun örnek hazırlama basamaklarına gerek duyulmaksızın reaksiyon inhibisyonu azaltılabilir veya ortadan kaldırılabılır. İnhibitörün varlığı ve yokluğunda DNA polimeraz etkinliği araştırılarak, farklı inhibitörlerin etkileri karşılaştırılarak veya sığır serum albümini (BSA) gibi maddelerin inhibisyonu engelleme güçleri değerlendirilerek inhibitörlerin DNA polimeraz aktivitesi üzerine olan etkileri araştırılabilir [1,2]. DNA polimerazı etkileyen birçok inhibitör faktör ve madde bulunmaktadır, bunlardan bazılarının Tablo 2'de yer verilmiştir.

Çevresel örneklerde en sık bildirilen inhibitör grubu olan humik bileşikler (özellikle humik asit ve fulvik asit) halk sağlığı ve ekolojik araştırma sonuçlarını olumsuz olarak etkileyebilmektedir. Humik bileşiklerin litik enzimlere engel olarak ya da DNA ve proteince bağlanarak polimerazların hedef DNA'yı görmesini engellemek suretiyle inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca proteolitik enzimler ve denatüranlar da polimerazları inaktive edebilirler. Bu nedenle hücre parçalama işlemlerinde kullanılmaları halinde bu maddelerin ve enzimlerin mutlaka inaktive edilmeleri gerekir [1,21]. Mesela, numunenin kendisinde bulunan ya da organik DNA saflaştırma işlemi sırasında taşınan fenolik bileşikler polimerazlara bağlanarak ya da onları denatüre ederek reaksiyonu inhibe edebilirler [3]. Farklı DNA polimerazların fenole farklı derecelerde duyarlılık gösterdiği ortaya konmuştur. Bir çalışmada [22], %5 fenol varlığında *Tth* polimerazın DNA ve RNA bağımlı polimeraz aktivitelerini sürdürülebildiği, ancak *Taq* DNA polimerazın çok az bir miktar fenol varlığında bile inhibe olduğu gösterilmiştir. Dışkı içindeki bakteriyel proteazlar ve nükleazlar, hücre debris, safra asitleri ve diğer faktörler de hem fiziko-kimyasal yolla hem de enzimatik etki ile amplifikasyonu önleyebilirler [1,21]. Dışkıdaki safra tuzlarının ve fitik asidin de DNA polimeraz üzerinde doğrudan etkisi olan DNA polimeraz inhibitörleri olarak işlev gördüğü ve kan örneklerinde bulunan hemoglobin ve hematinin DNA polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [3]. Kazanılmış immün yetmezlik sendromlu (AIDS) ve organ transplantasyonlu hastalarda antiviral tedavide kullanılan nükleotid analogu

asiklovir trifosfatın DNA polimeraz inhibisyonuna sebep olduğu da gösterilmiştir [23].

Bir diğer inhibisyon mekanizması ise uygun primer-hedef eşleşmesinin olmaması ve bu durumla ilişkili olarak DNA polimerazın doğru çalışmamasıdır. Bu sorun primer tasarımının dikkatli yapılması ile önlenabilir. İdrar örneklerinde bulunan üre ise polimeraz denatürasyonuna yol açarak inhibisyona neden olabilmektedir [1,21]. Çeşitli melanin türevleri DNA polimeraz ile geri dönüşümlü (*reversible*) kompleks yapılar oluşturarak, polisakkaritler ise nükleik asit yapısını taklit ederek enzimatik süreci bozabilmektedir [24].

2. Nükleik asitlerin yakalanması (tutulması) veya parçalanması

Hedef (kalıp) veya primer DNA'nın bozulması veya sekestrasyonu da başarısız reaksiyonlara neden olabilmektedir. Nükleik asitlerin bloke olması veya bozulması ile ilişkili olan bu etkiler fiziksel, kimyasal veya enzimatik süreçler tarafından meydana getirilebilir [5]. Örneğin, DNA'nın birincil yapısı hidroliz, non-enzimik metilasyon, oksidatif hasar ve enzimatik bozulma nedeniyle dağılmaya karşı hassastır [25]. Hedef nükleik asit olarak RNA araştırılacaksa, bu molekülün bazı koşullarda DNA'ya göre daha az stabil olduğu unutulmamalıdır. DNA'nın alkali ortamda denatüre olmasına rağmen stabil kaldığı, ancak RNA'nın yüksek pH'da kolayca bozulduğu bilinmektedir.

Nükleik asit kaybının önemli bir nedeni de nükleazların neden olduğu enzimatik bozulmadır. Nükleazlar çeşitli bakteriler, test edilecek numune veya dikkatsiz kullanım nedenleri ile numunenin kontamine edilmesi yoluyla, bazı durumlarda ise çalışılan hedef organizmalar aracılığı ile reaksiyon karışımına bulaşabilirler. Örneğin, stafilokok termonükleazının termal döngü esnasında tahrip olmadığı ve PCR duyarlılığını sınırladığı gösterilmiştir. Ayrıca, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin varlığında nonspesifik DNA otodegradasyonu meydana gelebilmektedir [5].

Nonspesifik blokaj veya sekestrasyon nedeniyle hedef veya primer DNA'nın kullanılamaması amplifikasyonu inhibe edebilen diğer bir durumdur. Çok sayıda çalışmada bakteriyel hücreler veya hücresel debrisin,

proteinlerin ve polisakkaritlerin; polimerazların hedef DNA'yı kullanmasını engellemek gibi fiziksel etkilerle inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. PCR için inhibitör olduğu rapor edilen süt proteinleri aynı zamanda DNA ile yüksek molekül ağırlıklı kompleksler oluşturarak kısıtlayıcı etki gösterebilir. Benzil klorid kullanılan bir ekstraksiyon prosedürü veya DNA ve polisakkaritlerin diferansiyel çözünme ve çökeltimesi yöntemleri ile mantar hücrelerinde bulunan yüksek molekül ağırlıklı polisakkaritlere bağlı inhibisyonun etkin olarak önlenildiği gösterilmiştir [5]. İmmüoglobulin G'nin (IgG) tek sarmallı genomik DNA'ya bağlanarak polimerizasyonu inhibe ettiği ve dolayısıyla primer bağlanmasına müdahale ettiği öne sürülmüştür [3]. Nükleik asit inhibitörü olarak tanımlanan bir diğer molekül de kemik polimeri kollajendir. Kollajen DNA polimerazın kalıp DNA ile etkileşiminin önlenmesine neden olur. Selüloz ve bilirübin, DNA'ya bağlanarak polimerizasyona müdahale ettiği belirtilen diğer bileşiklerdir [3].

Bir çalışmada vajinal mikroorganizmaların varlığı nedeniyle sperm genotipleme testlerinin inhibe olduğu gösterilmiş ve iki olası mekanizmaları sürülmüştür [26]. Söz konusu çalışmada ilk olarak küçük, kırılmış, tek iplikli mikrobiyal DNA'ların hedef sekanslara bağlanarak primer-hedef bağlanmasını engellemiş olabileceği ve ikinci olarak da primerlerin hedeflenmeyen mikrobik DNA'lara bağlanması nedeniyle etkin primer konsantrasyonunun azalmış olabileceği düşünülmüştür. Bununla beraber, yüksek sayıda hedeflenmeyen mikroorganizma varlığının PCR için zararlı olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [5].

Hedef DNA hücre lizisi sonrasında fizikokimyasal metotlar uygulanarak yıkıcı bileşiklerden mümkün olan en kısa sürede ayrıştırılırsa, nükleik asit sekestrasyonu ve yıkımı sorununun üstesinden gelenebilir. Ayrıca nükleazların yok edilmesi için ısı ve proteazlar da kullanılabilir. Ancak, proteazlar kullanıldığında bu enzimlerin polimerazları inaktive etmesini engellemek amacıyla polimerazlar eklenmeden önce bu proteazlar ortadan kaldırılmalıdır. Serum proteinleri de bloke edici ajanlar gibi hareket edebilir ve polimerazın hedef DNA'ya erişimini engelleyebilirler [5]. Otoklavlama, UV ışması ve

patolojik örneklerin fiksasyon işlemleri de nükleik asitlerin yapısını bozabilmektedir [27].

3. Başarısız hücre parçalanması

Amplifikasyonda kalıp olarak kullanılacak nükleik asitlerin açığa çıkarılması (ekstraksiyonu) PCR'ın temel basamaklarından biridir. Nükleik asit ekstraksiyonu genel olarak hücre çeperinin yıkılması ve nükleik asitlerle kompleks yapılar oluşturan proteinlerin (DNA-bağlayıcı proteinler gibi) ayrıştırılmasını kapsar. Bu basamağı inhibe eden faktörler başlangıç hedef kopya sayısının düşük olmasına ve amplifikasyonun başarısızlıkla sonuçlanmasına yol açabilirler. Hücre lizisi için geliştirilen protokoller fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin bazılarını veya tamamını içerebilir. Yetersiz hücre lizisi uygun olmayan reaksiyon koşulları ve enzim inaktivasyonundan kaynaklanabileceği gibi, litik enzimin düşük kaliteli olmasından veya düşük yoğunlukta kullanılmasından da kaynaklanabilir. Lizis için kullanılan enzimlerin inhibe olması nükleik asit ekstraksiyonundaki başarısızlığın önemli nedenlerinde biridir. Proteolitik enzimler ve denatüranlar bu enzimleri yıkabilirler. Numunede bulunan ya da organik DNA saflaştırma işleminden taşınan fenolik bileşikler polimerazlarda olduğu gibi hücre lizisi için kullanılan enzimleri de denatüre edebilirler. Başarılı DNA amplifikasyonu için hücre duvarı yapılarının parçalanmasının yeterli olmayabileceği ve PCR'ı inhibe ettiği bilinen hücresel debrisin enzimatik yolla yıkılarak uzaklaştırılmasının gerekli olduğu da akılda tutulmalıdır [5]. Sonuç olarak litik enzimler için geçerli olan tüm bu inhibitör etkiler PCR duyarlılığında azalmaya veya reaksiyonun tamamen inhibe olmasına neden olabilmektedir.

Hücre parçalanması farklı etkenler tarafından inhibe edilebilmektedir. Bir çalışmada, *Listeria* seçici besiyeri içindeki yüksek tuz konsantrasyonunun hücre parçalanmasına engel olduğu ve AccuProbe DNA prob testinde yanlış-negatif reaksiyonlara yol açtığı tespit edilmiştir [28]. PCR'ın da benzer şekilde etkilenmesi muhtemeldir. Wilson IG [5], laboratuvar tecrübelerini de aktardığı bir derlemede *Staphylococcus aureus* ile çalışılırken lizostafin ile tutarsız lizis olabileceğini bildirilmiştir. Ayrıca, bazı hücreler için büyüme döngüsü aşaması ve besin

koşulları da parçalanma duyarlılığı için önemli olabilir. Bazı PCR protokolleri ekstraksiyonun verimli olabilmesi için sıvı besiyerlerinde üretilmiş taze hücrelerin kullanılmasını önermektedir. Fakat bu faktörler çok az çalışılmıştır [5].

Hücre lizisinde kullanılan diğer bir yöntem de hücrelerin kaynatılma yoluyla parçalanmasıdır. Kaynatma ile pürifikasyon aşamasına gerek kalmadan PCR'ın saflaştırılmamış DNA üzerinden başarıyla yapılabildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [29]. Bu yaklaşım ekstraksiyon protokolleri ile kıyaslandığında önemli ölçüde zaman kazandırır. Ancak, reaksiyon tüpü içine yüklenen hücreler yeterince parçalanmamışsa ve kaynatma işlemi sonunda DNA "yapısal ve DNA-bağlayıcı proteinlerden" yeterli derecede ayrıştırılmazsa PCR inhibe olabilir [5].

4. Reaksiyon komponentlerinden birinin engellenmesi

PCR karışımında yer alan maddelerden polimeraz, kalıp DNA ve primerleri etkileyen inhibitörlerden bazılarını yukarıda kısaca değinildiği için bu başlıkta diğer komponentleri (dNTP'ler ve Mg^{++} gibi) etkileyen inhibitörlere değinilecektir. *Taq* polimeraz için kritik bir kofaktör olan Mg^{++} iyonlarının konsantrasyonu amplifikasyonun başarısını ve özgüllüğünü önemli ölçüde etkilemektedir. Mg^{++} iyonlarının çeşitli bileşikler tarafından sekestrasyonu veya Ca^{++} iyonları tarafından interfere edilmesi (engellenmesi) amplifikasyonu inhibe edebilir. Mesela, süt içinde yoğun olarak bulunan Ca^{++} iyonları sütün PCR için inhibitör etkili olmasının bir nedeni olabilir [5]. Bir çalışmada kollajenin amplifikasyon karışımı içindeki magnezyum iyon konsantrasyonunu kısmi olarak değiştirdiği ve PCR'ı inhibe ettiği gösterilmiştir [13]. Serbest Mg^{++} 'a 1:1 molar oranda bağlanan dNTP'ler yüksek konsantrasyonlarda Mg^{++} iyon konsantrasyonunu düşürebilirler [2]. Yine nazofaringeal örnek alımında kullanılan kalsiyum aljinatlı swaplardaki Ca^{+++} 'un ve Mg^{++} asorbsiyonu yapan aljinatın da Mg^{++} konsantrasyonunu değiştirerek PCR inhibisyonuna neden olabildiği bilinmektedir [20].

5. Floresans inhibisyonu

Teknolojik gelişmelere bağlı olarak geleneksel PCR testlerinin yerini günümüzde gerçek zamanlı

(real-time) PCR temelli testler almıştır. Floresan boyaların kullanıldığı bu yöntemde amplifikasyon ürünleri reaksiyon devam ederken gerçek zamanlı olarak görüntülenebilmekte ve amplifiye ürünlerin miktar tayini (kantitasyonu) yapılabilmektedir [30]. Floresan sinyal PCR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır [31]. Bu teknik, otomasyon derecesini büyük ölçüde geliştirirken analiz süresini kısaltmış, ancak beraberinde floresan sinyalini etkileyen yeni PCR inhibitörlerini ortaya çıkarmıştır [20]. Florofor boyanın işlevini bozan herhangi bir madde sinyali söndürme yolu ile, analize zarar verebilmektedir [3]. Floresans söndürme, çarpışmalı (*collisional*) söndürme ve statik söndürme mekanizmaları ile gelişebilir. Çarpışmalı söndürmede, inhibitör molekül uyarılmış durumlu floroforla temas ederken, statik söndürmede söndürücü madde florofor ile non-floresan bir kompleks oluşturur [3].

Real-time PCR'da çoğalan amplifikasyon ürünlerini saptayabilmek için ilk dönemlerde etidyum bromür kullanılmıştır [32]. Günümüzde ise prob temelli olmayan PCR uygulamalarında bu molekülün yerine bir siyanin boyası olan SYBR Green 1 kullanılmaktadır. Bununla beraber bu boya düşük-orta konsantrasyonlarda kullanıldığında dsDNA'ya yüksek afinite ile bağlanarak DNA çift sarmalının erime ısısını yükseltmekte (10°C kadar) ve inhibisyona neden olabilmektedir [3]. EvaGreen, SYTO-9 ve SYTO-82 gibi alternatif boyaların dsDNA'ya affinitesi ise daha azdır [33,34]. Yine toprak ve suda bulunabilen humik bileşiklerden en bilineni olan humik asidin DNA polimeraz üzerinden PCR inhibisyonuna sebep olduğu bilinmektedir [3]. Son zamanlarda humik asidin floresan inhibisyonu ile real-time PCR'da amplikon saptanmasını azalttığı da gösterilmiştir. Humik asit ilişkili inhibisyon bu molekülün çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan boyalar ile statik etkileşime girerek söndürücü (*quencher*) etki göstermesi şeklinde gerçekleştirilmektedir [32]. Humik asidin bu etkisini azaltmak için SYBR Green I ve EvaGreen gibi floresan boyaların konsantrasyonlarının artırılabilirliği düşünülmüş, fakat bu durumda da amplifikasyon basamağının inhibe olduğu gözlenmiştir. Bu sorun da farklı floresan boyaların farklı konsantrasyonlarda karıştırılması ile çözülmüştür.

Real-time PCR'ın günümüzde en yaygın kullanım şekli ise prob temelli sistemlerdir. Bu sistemlerde floresan boya olarak 6-karboksifluoresin (FAM) yaygın olarak kullanılırken bu boya ile birlikte söndürücü olarak genellikle 6-karboksitetrametil-rodamin (TAMRA) tercih edilmektedir [3]. Yaygın kullanılan hidroliz problemlerinin (*TaqMan probe*) tasarımlarında oligonükleotitlere bağlı olarak bulunan boya ve söndürücü birbirine yakın olduğu sürece floresan ışımaya engellenirken, DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesine bağlı olarak oligonükleotitlerdeki fosfodiester bağlarının yıkılması ile boya ve söndürücü arasındaki uzaklığın artmasıyla floresan ışımaya gerçekleşir. PCR karışımındaki olası iyon dengesizlikleri DNA polimerazın zincir sentezi aktivitesini (polimerizasyon) inhibe etmesi yanında 5'→3' ekzonükleaz aktivitesini de azaltarak *TaqMan* probunun hidrolizini inhibe edebilmekte ve böylece reaksiyonu çift yönden olumsuz olarak etkileyebilmektedir [20].

Hemoglobinin PCR boyunca DNA polimerazın aktivitesini azaltması yanında, floresan boyalara bağlanarak statik floresan söndürmeye neden olduğu öne sürülürken, hematinin de benzer etkilere neden olduğu ancak daha zayıf bir inhibitör olduğu düşünülmektedir. DNA ekstraksiyon protokollerinde kullanılan ditiyotreitölün (DTT) de, floresan söndürücü olarak hareket ettiği bilinmektedir [3].

PCR İnhibisyonunun İzlenmesi

Tanısal PCR'de, rutin tanıda bir numunenin PCR inhibitörlerinden etkilenip etkilenmediğini bilmek hayati önem taşır ve yanlış negatif sonuç riski, tanısal PCR'ın en büyük dezavantajlarından biridir [3,20]. Metot validasyonu, geliştirilen testlerin ilgili numuneler için iyi performans göstermesini sağlamak için uygulama öncesi bir ön koşuldur. Bir validasyon çalışmasında araştırılması gereken genel performans karakteristiklerinin yanı sıra (saptama alt sınırı, özgüllük, doğruluk ve kesinlik gibi), PCR inhibisyonu da doğru bir şekilde ele alınmalıdır [3]. PCR inhibisyonu ayrıca PCR ile ilişkili standart dizi analizi, MPS (massively parallel sequencing), DNA çip, PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), ters hibridizasyon testleri ve

lumineks teknolojisi gibi PCR ürünlerinin ileri analizinin yapıldığı testlerden elde edilecek sonuçları da olumsuz olarak etkileyecektir [3].

Düşük bir inhibisyon seviyesi bile, amplifikasyon etkinliğini ve saptama sınırını etkileyerek DNA konsantrasyonlarının olduğundan daha düşük seviyelerde ölçülmesine neden olabilir. PCR inhibitörleri özellikle test edilecek örneklerin zorlu bir matrisle kombinasyon halinde düşük miktarlarda nükleik asit içermesi durumunda önem kazanmaktadır [3]. En basit önlem olarak çok az miktarda kalıp DNA içeren numunelerin konsantre edilmesi, inhibitör içerdiği düşünülen numunelerin ise saflaştırılması gerekir [20]. PCR inhibisyonunu değerlendirmek için çeşitli prosedürler geliştirilmiştir. Amplifikasyonun izlenmesinde İnternal kontrol kullanılması, amplifikasyon verimliliğinin hesaplanması ve amplifikasyon eğrisinin modellenmesi bu yöntemlerden bazılarıdır [20].

Rutin analizde PCR inhibisyonunu izlemenin en hızlı ve en kolay yolu, hedefle aynı anda amplifiye edilen bilinen bir miktarda DNA fragmanının eklenmesini içeren bir internal kontrol kullanmak veya reaksiyon karışımına örnekte var olduğu bilinen bir geni (human GAPDH geni gibi) hedefleyen primerler ve prob eklemektir [20,35]. Tüm inhibisyon seviyelerini tespit etmek için, internal kontrolün amplifikasyonu en az hedef kadar PCR inhibitörlerine duyarlı olmalıdır. Bu noktada internal kontrol olarak hedeflenen gen bölgesinin boyutu önemlidir, çünkü inhibitörlerin varlığında kısa fragmanlar genellikle uzun olanlardan daha kolay amplifiye edilir. Bu nedenle inhibisyon kontrolünün daha güvenilir olması adına hedef molekülden daha uzun bir internal kontrol ampikonunun kullanılması önerilmektedir [20].

Amplifikasyon verimliliği (AV), bir DNA seyreltme serisi analizinden elde edilen standart bir eğrinin eğiminden hesaplanabilir. Hesaplanan AV değerinin eksponensiyel (üstel) amplifikasyon göstergesi olan 1.0'den sapması, numunedeki PCR inhibisyon seviyesinin bir göstergesidir. AV değeri kullanılarak inhibisyonu ölçmenin en sistematik yolu, numuneyi hedefin dışındaki bir kaynaktan farklı miktarlarda saf DNA ile başlatarak bu yabancı DNA'ya ait standart bir eğri

oluşturmaktır. Bu şekilde PCR inhibitörlerinin seviyesi tüm DNA seyreltmeleri için sabit tutulur ve inhibe edilmiş bir örnek 1.0'dan daha düşük bir AV değeri verir. Yabancı DNA kullanımı, sonuçların önyargılı olmasını sağlayacak olan DNA veriminin etkisini ortadan kaldırır. Bir numunenin PCR inhibisyonu, bilgisayar modellemesi kullanılarak amplifikasyon eğrisinin matematiksel olarak yorumlanmasıyla da araştırılabilir. Bu yaklaşım reaksiyonun kinetiklerindeki farklılıklar nedeniyle inhibitörlerden etkilenen bir eğrinin, saf bir örnekten elde edilenden farklı olması prensibine dayalıdır. İnhibisyonlu bir numune genellikle daha az "üstel" bir eğri verir. Uç nokta floresan değeri de inhibitörler tarafından düşürülebilir [20].

Alternatif DNA polimerazların ve tampon sistemlerinin kullanımı ile zorlu numuneler için PCR İnhibisyonunun üstesinden gelinir. Ayrıca, PCR inhibitörlerine daha fazla tolerans elde etmek için, tamamlayıcı veya sinerjistik DNA polimerazların karışımları da uygulanabilir. Tampon kompozisyonu inhibitörlerin varlığında polimerizasyonu geliştirmek için değiştirilebilir (örneğin yüksek bir pH uygulanması). Ayrıca, iyon içeriğini değiştirmek veya çeşitli kolaylaştırıcılar (bovine serum albümin; BSA gibi), eklemek de PCR inhibitörlerine karşı daha yüksek bir direnç sağlayabilir. Alüminyum saplı ve kalsiyum aljinatlı çubuklar yerine, plastik saplı ve Dacron fiber uçlu svaplar kullanılarak yapılan örneklemeler ile inhibisyonun önüne geçilebilir [36].

Sonuç

PCR temelli testlerde çalışılan örnekten, örnek hazırlama sürecinde kullanılan kimyasal ve enzimlerden, testi çalışan kişilerin örnekleri kontamine etmesinden kaynaklı inhibitör etkiler özellikle düşük miktarlarda kalıp DNA ve yüksek miktarda istenmeyen matris içeren numunelerin analizinde yanlış negatif test sonuçları şeklinde karşımıza çıkabilmektedir. İnhibitör maddelerin etkilerini ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için PCR protokollerine stabilizatör özelliği olan veya inhibitörlerin spesifik etkilerini azaltan-önleyen bazı katkıları eklenebilmekte ve reaksiyonlar optimize edilmektedir. SARS-CoV-2 pandemisinde ayrıca önem kazanan moleküler testlerin sonuçlarının yorumlanmasında klinik örneklerin doğru alınıp alınmadığı, hastanın

enfeksiyonun hangi döneminde olduğu, çalışılan örneğin tipi önemli olduğu gibi, PCR inhibisyonuna bağlı yanlış negatif sonuçların da dikkate alınması ve test optimizasyonları ile ilgili süreçlerin dikkatle gözden geçirilmesi önem arz etmektedir. Toprakta, atık sularda, çürümüş dokularda ve sayısız inhibitör maddenin yoğun olarak

bulunduğu insan bağırsaklarında trilyonlarca bakteri DNA'sı kusursuzca ve bir denge içerisinde replike olmaya devam ediyor. Bu hayranlık uyandırıcı düzen ve denge bizlere her problemin bir çözümü olduğunu hatırlattığı gibi, bilim dünyasını bu çözümleri bulmak için teşvik ediyor diyebiliriz.

Çıkar beyanı: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazarlar sorumludur.

Finansal destek: Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

Kaynaklar

1. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Dahlenborg M, Löfström C. Pre-PCR Processing of Samples. In: Sachse K, Frey J (eds), PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. 2003, Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp:31-50.
2. Lübeck PS, Hoorfar J. PCR Technology and Applications to Zoonotic Food-Borne Bacterial Pathogens. In: Sachse K, Frey J (eds), PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. 2003, Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp:65-86.
3. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. Anal Bioanal Chem 2020; 412(9): 2009-23. [[Crossref](#)]
4. Lantz PG, Abu al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. Biotechnol Annu Rev 2000; 5: 87-130. [[Crossref](#)]
5. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 1997; 63(10): 3741-51.
6. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 345-50.
7. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 485-93. [[Crossref](#)]
8. Al-Soud WA, Rådström P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl Environ Microbiol 1998; 64(10): 3748-53.
9. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol 2004; 26(2): 133-46. [[Crossref](#)]
10. Weyant RS, Edmonds P, Swaminathan B. Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. Biotechniques 1990; 9(3): 308-9.
11. Loffert D, Stump S, Schaffrath N, Berkenkopf M, Kang J. PCR: effects of template quality. Qiagen News 1997; 1: 8-10.
12. Schanfield MS. DNA Testing in Forensic Science. In: Meyers RA (ed), Encyclopedia of Physical Science and Technology. 2001, 3th ed, Academic Press, London. pp:589-602.
13. Kim S, Labbe RG, Ryu S. Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of Clostridium perfringens. Appl Environ Microbiol 2000; 66(3): 1213-5. [[Crossref](#)]
14. Durmaz R. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde sorunlar ve standardizasyon. Mikrobiyol Bul 2000; 34(1-2): 157-74.
15. Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. J Clin Microbiol 1991; 29(4): 676-9.
16. Ahokas H, Erkkilä MJ. Interference of PCR amplification by the polyamines, spermine and spermidine. PCR Methods Appl 1993; 3(1): 65-8. [[Crossref](#)]
17. de Lomas JG, Sunzeri FJ, Busch MP. False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder. Transfusion 1992; 32(1): 83-5. [[Crossref](#)]
18. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl Environ Microbiol 1996; 62(3): 1102-6.
19. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Deoxynucleotide Triphosphates and Buffer Components (Chapter 6). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 2008, Springer, New York. pp:91-102.
20. Hedman J, Rådström P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. Methods Mol Biol 2013; 943: 17-48. [[Crossref](#)]
21. Rådström P, Lövenklev M, Wolffs P, Löfström C, Knutsson R. Pre-PCR processing strategies. In: Weissensteiner T, Griffin HG, Griffin AM (eds), PCR

Technology: Current Innovations. 2003, 2nd, CRC/Taylor & Francis, New York. pp:37-45.

22. Katcher HL, Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *Biotechniques* 1994; 16(1): 84-92.

23. Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, et al. Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation* 1996; 62(2): 238-42. [[Crossref](#)]

24. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012; 113(5): 1014-26. [[Crossref](#)]

25. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; 362(6422): 709-15. [[Crossref](#)]

26. Lienert K, Fowler JC. Analysis of mixed human/microbial DNA samples: a validation study of two PCR AMP-FLP typing methods. *Biotechniques* 1992; 13(2): 276-81.

27. Ballari RV, Martin A. Assessment of DNA degradation induced by thermal and UV radiation processing: implications for quantification of genetically modified organisms. *Food Chem* 2013; 141(3): 2130-6. [[Crossref](#)]

28. Partis L, Newton K, Murby J, Wells RJ. Inhibitory effects of enrichment media on the Accuprobe test for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(5): 1693-4.

29. Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by

DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol* 1989; 27(6): 1257-61.

30. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209-19. [[Crossref](#)]

31. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol* 2017; 8: 108. [[Crossref](#)]

32. Jansson L, Koliana M, Sidstedt M, Hedman J. Blending DNA binding dyes to improve detection in real-time PCR. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2017; 14: 34-37. [[Crossref](#)]

33. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(19): e127. [[Crossref](#)]

34. Eischeid AC. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes* 2011; 4: 263. [[Crossref](#)]

35. Şahiner F, Kubar A, Gümral R, Ardiç M, Yiğit N, Şener K, et al. Efficiency of MY09/11 consensus PCR in the detection of multiple HPV infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 80(1): 43-9. [[Crossref](#)]

36. Wadowsky RM, Laus S, Libert T, States SJ, Ehrlich GD. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4): 1054-7.