



Polimeraz Zincir Reaksiyonu İnhibitörleri*

Polymerase Chain Reaction Inhibitors

Begüm Maşlak¹, A. Funda Bağcıgil²

ÖZET

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), istenilen gen bölgelerinin in-vitro koşullarda kopyalanması, çoğaltılması ve elde edilen ürünlerin gözle görülebilir bir hale getirilerek saptanması prensibine dayanan bir yöntemdir. PZR' nin hızlı ve primerlerinin özelliğine göre spesifik olması, duyarlılığının yüksek olması gibi avantajlarının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri; sonuçların değerlendirilmesinde karşılaşılan güçlükler, yanlış pozitiflikler ve yanlış negatifliklerdir. Yanlış negatifliklerin en önemli sebebi de PZR inhibitörleridir. Veteriner hekimliğinde, başta tanı amaçlı olmak üzere moleküler incelemeler amacıyla sıklıkla incelenen örnekler dışkı, kan ve iç organlardır. Bu derlemede, bahsedilen örnekler içerisinde yer alan inhibitör maddeler, bu maddelerin etki mekanizmaları ve son olarak da bunların eliminasyonu için önerilen yöntemler açıklanacaktır.

Anahtar kelimeler: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PZR, PZR inhibitörleri, eliminasyon yöntemleri, veteriner mikrobiyolojisi

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is a method which is based on the principle that the desired gene regions are copied and reproduced in-vitro conditions and that the obtained products are made visible. PCR has advantages such as rapidity and specificity related with selected primers and high sensitivity. However, it has some disadvantages. The most important disadvantages are; difficulties encountered in evaluating the results, false positives and false negatives. And the most important cause of false negatives is the PCR inhibitors. In veterinary microbiology, major samples sent for diagnostic purposes and molecular examinations are blood, necropsy materials and stool samples. In this review, the major inhibitory substances in the samples for molecular examinations, their action mechanisms and the methods recommended for the elimination of these substances will be explained.

Keywords: Polymerase Chain Reaction, PCR, PCR inhibitors, elimination methods, veterinary microbiology

¹ Vet. Hek., İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding author:

Begüm Maşlak,
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
Tel: +90 554 731 16 76
E-mail: begummaslak@gmail.com

Geliş tarihi / Date of receipt: 09.01.2018

Kabul tarihi/Date of acceptance: 23.03.2018

* Bu çalışma 19. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresinde poster olarak sunulmuştur

GİRİŞ

Nobel ödüllü bilim insanı olan Kary Mullis tarafından 1983 yılında geliştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), istenilen gen bölgelerinin in-vitro koşullarda kopyalanması, çoğaltılması ve elde edilen ürünlerin gözle görülebilir bir hale getirilerek saptanması prensibine dayanan bir yöntemdir.²⁰ Özellikle tıp biliminin uygulamalı alanlarında, gen regülasyonu çalışmaları, infeksiyonların, neoplastik ve kalıtsal hastalıkların tanısında kullanılmaktadır.^{1, 11, 12, 17, 26} Veteriner hekimliği mikrobiyolojisinde de son yıllarda, izolasyon ve identifikasyon protokolleri uzun ve zahmetli olan etkenlerin ya da kültürü yapılamayan bakterilerin saptanmasında ve moleküler tiplendirme gibi birçok farklı alanda PZR kullanımını artmıştır.^{7, 8, 13}

Hızlı, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir yöntem olarak kabul gören PZR, mikrobiyoloji alanında tanıda birçok avantaja sahiptir. Örneğin organ ve dokularda etkenin sayıca az olduğu durumlarda, inceleme örneğinin kültür için uygun olmayacak dercede eski olduğu durumlarda PZR ile etkenin DNA'sını saptamak ve tanı mümkün olmaktadır.²⁰ Ayrıca, kültürü zor ve uzun olan infeksiyonların tanısını kolay ve kısa sürede sonuçlandırmak mümkündür.¹³ Aynı zamanda mikroorganizmalar, tümörler ve diğer hastalıklarda da gen ekspresyon seviyelerinin değişikliğini analiz etmekte kullanılabilmektedir.^{11, 12, 26, 29}

Bunun yanında ilk kurululumunun masraflı olması, ekonomik yönden atlanmaması gereken bir durumdur. Atlanmaması gereken bir diğer nokta çalışma esnasında en küçük DNA kontaminasyonunun dahi yanlış sonuçların alınmasına sebep olabileceği durumudur.¹⁷ Test sonuçlarının yorumlama aşamasında deneyimli personel gerekmektedir. Primerlerin spesifitesindeki sorunlar nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar oluşabilmekte, ya da istenilenin dışında farklı bantlar oluşabilmektedir. Hedef DNA' da yer alan benzer fakat tamamen aynı olmayan gen dizilerine primerlerin bağlanması da yanlış negatifliklerin sebeplerinden birisidir.^{2, 9, 17, 31} Yanlış negatifliklerin en önemli sebeplerinden biri de inceleme örneklerinde ya da nükleik asit ekstraksiyonunda bulunan PZR inhibitörleridir.^{17, 29, 36}

Veteriner hekimliği mikrobiyolojisinde başta tanı amaçlı olmak üzere; moleküler incelemeler için dışkı, kan ve nekropsi materyalleri (iç organ) sıklıkla gönderilmektedir. Bu derlemede de sıklıkla kullanılan bu inceleme örneklerinde bulunan PZR inhibitörleri, etki mekanizmaları ve son olarak da bunların eliminasyonu için önerilen bazı yöntemler açıklanmaktadır.

PZR İnhibitörleri Nelerdir?

PZR inhibitörleri, organlar, kan, vücut sıvıları gibi biyolojik materyal çeşitlerinde; su, toprak ve hava gibi çevresel örneklerde; et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri gibi çeşitli gıda maddelerinde bulunabilirler. Bunlara ek olarak materyallerin laboratuvara taşınması sırasında, laboratuvar örneğinin hazırlanışı aşamasında veya nükleik asit ekstraksiyonunda istenmeden de olsa inhibitör maddeler katılabilmektedir.^{4, 9, 10, 16, 18, 22, 23, 29, 33, 37}

Bir inceleme örneği birçok farklı inhibitörü içerebildiği gibi, aynı inhibitörler farklı materyal kaynaklarında da bulunabilmektedir. Kalsiyum iyonları inorganik materyallerde bulunan inhibitörlere örnektir, organik materyallerdeki inhibitörler arasında ise; safra tuzları, üre, fenol, etanol, polisakkaritler, SDS, humik asitler, tannik asit, melanin ve bunların yanı sıra bazı farklı proteinler kollajen, myoglobin, hemoglobin, laktoferrin, IgG ve proteinaz yer almaktadır.^{24, 25}

Kan, serum ya da plazma örneklerinde bulunan IgG, hemoglobin ve laktoferrin, heparin gibi anti-coagülanlar, hormonlar ve bazı antiviral maddeler (asiklovir v.b.), inhibitörler arasında yer almaktadır.³ Kan ve kas dokusu gibi klinik örneklerinin içinde yer alan laktoferrin ve myoglobin de inhibitör etkiye sahiptir.^{3, 6, 24, 37} Dışkı örneklerinin etkisi içeriğine bağlıdır ki bu da hastanın beslenmesine, yaşadığı çevreye ve sindirim sisteminin var olan mikroorganizma florasına bağlıdır. Dışkı örneklerindeki başlıca inhibitörler; kompleks polisakkaritler, bitki ve sebze orjinli klorofil, safra tuzları, üre, glikolipidler, hemoglobin ve heparindir. En önemlileri ise safra asitleri ve onların tuzlarıdır.^{7, 19, 24} İdrar örneklerindeki en kritik bileşen ise üredir ve polimerazın bozulmasına neden olmaktadır.³⁶ Ürenin inhibitör etkisi konsantrasyonuna bağlıdır ve konsantrasyon

50 mmol⁻¹ olması durumunda inhibitör etkisi başlamaktadır.¹⁶

Peynirde ve sütte proteaz (plazmin) ve kalsiyum iyonları gibi inhibitör maddeler saptanmıştır.^{4, 23, 25}

İnceleme örneklerinin yapısında bulunan maddelerin dışında, bir de örnekleme işlemleri veya nükleik asit ekstraksiyonu aşamasında PZR' ye dahil olan maddelerin de bir kısmının PZR'de inhibitör özellikleri bulunmaktadır. NaCl, KCl gibi tuzlar, deterjanlar (iyonik ve non-iyonik), organik moleküller, EDTA, etanol, izopropil alkol ya da fenol gibi maddeler hücre lizisi ve saf nükleik asit hazırlanması için gereklidir, ancak aynı zamanda bu bileşenlerin belirli konsantrasyonları inhibitör etkiye de sebep olmaktadır.^{21,25} Bununla birlikte ekstraksiyon işlemleri sırasında kullanılan eldivenlerin pudra içeriği de inhibitör etki göstermektedir.⁹ Wadowsky ve ark. (1994), *Bordetella pertusis* tanısı için kullandıkları nazofaringeal sıvıların yapısında yer alan kalsiyum aljinat fiber maddesinin, inhibitör etkiye sebep olduğu saptanmış ve Dacron sıvab kullanımı önerilmiştir.³³ Konsantrasyonuna bağlı olmak koşulu ile UV ışınlanması etkisine maruz kalan, plastik PZR tüpleri ve mineral yağlar da inhibitör etkiye sahiptir.⁵

PZR İnhibitörlerinin Etki Mekanizmaları

Her bir inhibitör madde, PZR' nin farklı aşamasında dahil olabileceği gibi, etki şekilleri de farklı olmaktadır. Aynı kaynak materyalde yer alan farklı maddelerin inhibitör özelliği benzer olabileceği gibi, farklı materyalde yer alıp aynı etki şekillerine sebep olabilen maddeler de mevcuttur.

Başlangıç olarak, PZR' de kullanılan kalıp DNA; nükleaz ve diğer maddelerin etkileşimi ile değişime uğrayabilmekte ya da indirgenebilmektedir. Bu etki yüksek erime noktalarında meydana gelen yarışmacı bağlanma sebebi ile gerçekleşmektedir.¹ Hematin, DNA' nın erimesinin tamamlanmamasına sebep olarak inhibitör etki göstermektedir (Melting DNA).²¹ Yedidağ ve ark (1996), asiklovir gibi bazı antiviral maddelerin nükleotitler ile yarışarak DNA' nın uzamasını inhibe ettiklerini belirtmişlerdir.³⁷

DNA polimerazı, direkt ya da indirekt olarak etkileyen birçok PZR inhibitörü bulunmaktadır.

Örneğin proteaz, deterjanlar, üre ve fenol gibi maddeler DNA polimeraz enzimini indirgeyebilmektedirler. Kalsiyum, kollajen, hematin ve tannik asit ise polimeraz aktivitesini inhibe etmektedir. Ekzojenik DNA ise şablon ile yarışarak inhibitör etki gösterebilmektedir.^{21, 32} DNA muhafazası için kullanılan bazı kitlerin yıkama solusyonlarında bulunan EDTA, belirli konsantrasyonlarda olduğunda magnezyum iyonlarını tüketebilmektedir ve bu şekilde DNA polimeraz aktivitesinin inhibisyonuna sebep olmaktadır.²⁵ Deterjanlar, proteaz ve üre gibi maddeler polimerazın parçalanmasına sebep olmaktadır.^{23, 25, 26, 36} Kalsiyum, kollajen, hematin, bitkisel ara ürünler, IgG, melanin, myoglobin, polisakkaritler, sodyum ve tannik asit; DNA polimerazın inhibisyonuna veya transkriptaz aktivitesini tersine çevirerek inhibitör etki göstermektedirler.^{2, 3, 10, 21, 22, 35} Kalsiyum iyonları tüm bu etkilerinin yanısıra polimerazın kofaktörleri ile de yarışmaktadır.^{4, 21}

RNA üzerine etkisi olan maddelerin başında gelen fenoller, oksitleyici koşullar altında RNA'yı çapraz bağlayabilirler ve bu yetenekleri ile RNA izolasyonuna engel olmaktadır.³⁵ Polisakkaritlerin varlığı ise çöktürülmüş RNA kapasitesini azaltabilmektedir.³⁰ Yapılan birçok çalışmada görülmüştür ki polifenoller ve polisakkaritler; nükleik asit ile çökeltme aşamasında, çökeltilmiş RNA' nın tekrar süspansiyon haline gelme özelliğini indirgemektedirler.^{30, 34, 35}

Polifenoller ve polisakkaritler bu etki mekanizmalarının yanında; kollajen, melanin ve humik asitlerinin de sahip olduğu etki gibi nükleik asitlerin kimyasal özelliklerini de değiştirebilmektedirler (nükleik asitler ile çapraz bağlanma ile).^{21,35} Humik asitler aynı zamanda nükleik asit ve enzimlere tutunarak ya da onlara bağlanarak inhibitör etki gösterebilmektedirler.¹ Bakteri hücreleri ve hücre artıkları, deterjanlar, PZR katkı maddeleri, proteinler ve polisakkaritler, tuzlar ve solventler ise nükleik asitlerin parçalanmasına sebep olarak inhibitör etki oluşturmaktadırlar.^{6, 15, 22, 25, 36}

Metal iyonları ise primerlerin özelliklerini indirgeyerek inhibitör etkiye sahip olmaktadır.¹ Polifenoller ve tannik asit aynı zamanda metal iyonlarının şelasyonuna da sebep olmaktadır.^{1, 21} Ros-

sen ve ark. (1992)'nin çalışmasından görülmüştür ki; EDTA da magnezyum dahil olmak üzere metal iyonlarının şelasyonuna sebep olarak inhibitör etkiye neden olmaktadır.²⁵

PZR İnhibitörlerinin Eliminasyon Yöntemleri

Genel olarak, kategorize edilmiş belli başlı inhibitör maddelerin dikkatli kullanımının yanı sıra, bazı maddelere karşı spesifik eliminasyon yöntemleri de mevcuttur.

Seminal sıvı ve dışkı örneklerinin matrislerinde yer alan polisakkaritler gibi küçük proteinler ve tuzları elimine etmek için Sephacryl S-400, Sephadex G-200, Chelex, Sephadex ve cetrimonium bromide kullanılarak kolon kromatografisi uygulanmaktadır.^{8,14,27} Kromatografi hücre ekstraktlarından nükleik asitlerin saflaştırılması amacı ile kullanılan yöntemlerden birisidir. Dışkı örnekleri için ekstraksiyon aşamaları; Sedaphex G-200 kromatografi, PZR' den önce ısıtma işlemi uygulaması, BSA ya da gp32 eklenmesi, dirençli polimerazların seçilimi, kloroform ekstraksiyonu, aktif karbon ile işleme tutulması ve laboratuvar örneğinin seyreltilmesidir.^{2,7,14,19}

İdrar örneklerinde yer alan ürenin inhibitör etkisi, dializ ya da ultrafiltrasyon ile elimine edilebilmektedir.¹⁶ Kalsiyum iyonlarının inhibitör etkisi, magnezyum iyonlarının eklenmesi ile kompanse edilebilmektedir.⁴ Süt örneklerinde yer alan inhibitörler için BSA, proteaz inhibitörü ve magnezyum iyonlarının eklenmesi önerilmektedir.^{4,23} Peynir ve et ürünleri için ise dirençli polimerazların seçilimi ile inhibitör etki elimine edilebilmektedir.²

Nükleik asit izolasyonu için kullanılan manyetik silika boncukların kullanımının, etkili bir şekilde PZR inhibitörlerini kaldırdığı bildirilmiştir.¹⁸ Polifenollerin RNA ile etkileşimini ortadan kaldırmak amacıyla yüksek konsantrasyonda borat eklenmesi ve fenollerin etkisini ortadan kaldırmak için ise polivinylpyrrolidone kullanımı önerilmektedir.^{30, 34, 35} İmmuncapture yöntemleri de PZR inhibitörlerinin eliminasyonunda etkilidir.²⁸ Maher ve ark.,¹⁸ hava ve çevre örneklerinde yer alan inhibitör maddeler için Magnetic bead DNA capture method kullanımını önermişlerdir. Su ve çevre örnekleri için Sedaphex G-100 ve Chelex-100' ün kombine uygu-

laması, çözücülerin ekstraksiyonu, pozitif yüklü membranlar ile ultrafiltrasyon ve UV ışın uygulaması kullanılabilir.^{1,32}

SONUÇ VE ÖNERİLER

PZR inhibitörleri, yöntemin farklı aşamalarında değişik mekanizmalar ile etkilerini gösteren, birçok inceleme örneğinde bulunabilen maddelerdir. PZR' nin duyarlılığını olumsuz yönde etkiler ve yanlış negatifliklerin en önemli nedenleri arasındadır. PZR' nin ekstraksiyondan itibaren birçok aşamasında bu inhibitörlerin etkisini elimine etmek için farklı yöntemler önerilmektedir. Önemli olan yapılacak olan testin içindeki olası inhibitörleri önceden belirlemek ve önerilen yöntemlerden birini uygulamaktır. Ayrıca PZR karışımı içerisine ilave edilecek internal kontroller ile de reaksiyonun gerektiği gibi çalıştığının kontrol edilmesi de önemlidir. Veteriner mikrobiyolojisinde yaygın kullanımı olan PZR' nin güvenilir bir şekilde kullanılması için bu inhibitörlerin varlığı unutulmamalı ve her geçen gün yenilenen eliminasyon yöntemleri takip edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., Pepper I.L. (1993): Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction, *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1318–1324.
2. Al-Soud W.A., Radstrom P. (1998): Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3748–3753.
3. Al-Soud W.A., Radstrom, P. (2000): Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat, *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 4463–4470.
4. Bickley J., Short J.K., McDowell D.G., Parkes H.C. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions, *Letters in Applied Microbiology*, 22: 153–158.
5. Burgess L.C., Hall J.O. (1999): UV light irradiation of plastic reaction tubes inhibits PCR, *Biotechniques*, 27(2): 252–256.
6. Burkardt H.J. (2000): Standardization and quality control

- rol of PCR analyses, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(2): 87–91.
7. Chaturvedi U., ve ark. (2008): Detection of canine adenoviral infections in urine and faeces by the polymerase chain reaction, *Journal of Virological Methods*, 149(2): 260–263.
 8. Da Silva N., ve ark. (1995): Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen, *Journal of Virological Methods*, 55: 209–218.
 9. Demeke T., Jenkins G.R. (2010): Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 1977–1990.
 10. Eckhart L., Bach J., Ban J., Tschachler E. (2000): Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271: 726–730.
 11. Erlich H.A., Bugawan T.L. (1989): HLA class II gene polymorphism: DNA typing, evolution, and relationship to disease susceptibility. In: Erlich H.A. (ed.) PCR technology-Principles and application for DNA amplification, Stockton Press, 193-208.
 12. Garibyan L., Avashia N. (2013): research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR), *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3): e6.
 13. Giese S.B., Ahrens P. (2000): *Veterinary Microbiology*, 77 (3-4), 291-297.
 14. Hale A.D., Green J., Brown D.W. (1996): Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens, *Journal of Virological Methods*, 57: 195-201.
 15. Katcher H.L., Schwartz I. (1994): A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol, *Biotechniques*, 16: 84–92.
 16. Khan G., Kangro H.O., Coates P.J., Heath R.B. (1991): Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA, *Journal of Clinical Pathology*, 44: 360–365.
 17. Ma T.S. (1995): Applications and Limitations of Polymerase Chain Reaction Amplification, *CHEST*, 108: 1393-1404.
 18. Maher N., Dillon H.K., Vermund S.H., Unnasch T.R. (2001): Magnetic bead capture eliminates PCR inhibitors in samples collected from the airborne environment, permitting detection of *Pneumocystis carinii* DNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 449–452.
 19. Monteiro L., ve ark. (1997): Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model, *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 995–998.
 20. Mullis K.B. (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Scientific American*, 264: 56-65.
 21. Opel K.L., Chung D., McCord B.R. (2010): A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR, *Journal of Forensic Science*, 55: 25–33.
 22. Peist R., Honsel D., Twieling G., Loffert D. (2001): PCR inhibitors in plant DNA preparations, *QIAGEN News*, 3: 7–9.
 23. Powell H.A., ve ark. (1994): Protease inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction, *Letters in Applied Microbiology*, 18: 59–61.
 24. Radstrom P., ve ark. (2004): Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples, *Molecular Biotechnology*, 26(2): 133-46.
 25. Rossen L., Norskov P., Holmstrom K., Rasmussen O.F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions, *International Journal of Food Microbiology*, 17: 37–45.
 26. Saulnier P., Andremont A. (1992): Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction, *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2080–2083.
 27. Schmidt B.L., ve ark. (1995): Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in the urine and breast milk of patients with Lyme borreliosis, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 21: 121-128.
 28. Schrader C., Johne R., Schielke A., Ellerbroek, L. (2011): Food associated viruses and their detection – a review, *Journal of Food Quality*, 62: 36–51.
 29. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek, L., Johne R. (2012): PCR inhibitors – occurrence, properties and removal, *Journal of Applied Microbiology*, 113: 1014- 1026.
 30. Sipahioglu H.M., Usta M., Ocak M. (2006): Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods, *Journal of Virological Methods*, 137: 120–124.
 31. Smith C.J., Osborn A.M. (2009): Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 67, Issue 1, 6-20.

32. Tamariz J., Voynarovska K., Prinz M., Caragine T. (2006): The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA, *Journal of Forensic Science*, 51: 790–794.
33. Wadowsky R.M., ve ark. (1994): Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab, *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1054–1057.
34. Wan C.Y., Wilkins T.A. (1994): A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Analytical Biochemistry*, 223: 7–12.
35. Wilkins T.A., Smart L.B. (1996): Isolation of RNA from plant tissue. In *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis*, ed. Krieg, P.A. New York: Wiley-Liss, 21–42.
36. Wilson I.G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3741–3751.
37. Yedidag E.N., ve ark. (1996): Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus, *Transplantation*, 62: 238–242.