

RUTİN GERÇEK ZAMANLI PCR TANI TESTLERİNDE PCR İNHİBİTÖRLERİNİN ELİMİNASYONU VE İTERNAL AMPLİFİKASYON KONTROL SONUÇLARI

ELIMINATION OF PCR INHIBITORS IN ROUTINE DIAGNOSTIC REAL-TIME PCR ASSAY AND RESULTS OF INTERNAL AMPLIFICATION CONTROL

Murat SAYAN¹, Meliha MERİÇ², Suna ÇELEBİ¹, Ayşe WILLKE²

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Kocaeli. (sayanmurat@hotmail.com)

² Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kocaeli.

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) inhibitors which can be found in the clinical specimens lead to increased cost of these tests and also cause delay in the results particularly in the routine laboratories. Lysis/dilution methods are effective on the removal of PCR inhibitors and the performance of internal amplification control (IAC). This study was aimed to evaluate the effects of some methods, such as lysis (freezing and thawing) and dilution (1/10) of serum samples, used for the removal of PCR inhibitors, on IAC results. This evaluation was done by investigating the results of 1440 HCV-RNA and 2754 HBV-DNA (Fluorion HCV QNP and HBV QNP; Iontek, Turkey) tests that were performed in our laboratory during January 2005-October 2006 period. The nucleic acid isolation was done by "spin colon" (Qiagen, QIAamp[®] DNA Mini Kit, Germany) and "magnetic particle" (Qiagen, BioRobot EZ1, Germany) technologies and PCR was performed by real-time PCR (iCycler IQ - BioRad Lab., USA). False negative IAC was detected in 211 samples during HCV-RNA tests and correct results were obtained in 66.4% of these when inhibitors were removed by lysis in 121 and by serum dilution in 19 of the samples. For HBV-DNA tests false negative IAC was detected in 15 samples and application of lysis method yielded correct results in 73.3% (11/15) of these. By the application of inhibitor removal methods the rate of false negative IAC decreased from 14.6% to 4.9% (71/1440) in HCV PCR and from 0.5% to 0.1% (4/2754) in HBV PCR. These data indicated that lysis/dilution methods were simple, economical and effective methods that could be used in routine PCR laboratories for the removal of PCR inhibitors and to achieve effective IAC.

Key words: Real-time PCR, PCR inhibitors, internal control.

Sayın Editör,

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminde sıklıkla karşılaşılan inhibitörler arasında heparin, hem, lökosit DNA'sı, IgG ve hedef olmayan DNA gibi unsurlar sayılabilir¹. Nükleik asit izolasyonu aşamasından itibaren PCR test ortamına, inhibisyon ve örnek kayıplarının monitörizasyonu amacıyla internal amplifikasyon kontrolü (İAK) katılmakta ve negatif sonuçlar denetlenabilmektedir². Öte yandan tanısız PCR testlerinde İAK'nin zorunlu olarak kullanılması gerektiği tartışılmaktadır^{3,4}. PCR öncesi basamakta, inhibitörlerin örneklerden çıkarılması ya da azaltılması mümkündür⁵. Bu amaçla, spin kolon (SK) ve manyetik par-

tikül (MP) teknolojilerinin de içinde yer aldığı çeşitli nükleik asit izolasyon teknikleri bulunmakta ve ayrıca izolasyon öncesi işlemler ile inhibitörler etkisizleştirilebilmektedir¹.

Bu çalışmada, rutin PCR laboratuvarımıza gelen serum örneklerinde, lizis (dondurup çözme) ve serum örneğinin dilüsyonu (1/10 dilüsyon) gibi izolasyon öncesi PCR inhibitörlerini giderme işlemlerinin, İAK sonuçlarına olan etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca kan örneklerinde inhibitör unsurları gidermede kullanılacak çeşitli teknikler karşılaştırmalı olarak gözden geçirilmiştir. Bu amaçla nükleik asit izolasyon metodu olarak SK (Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit, Almanya) ve MP (Qiagen, BioRobot EZ1, Almanya) teknoloji kullanılan rutin PCR laboratuvarımızda (real-time PCR, iCycler IQ - BioRad Lab., ABD), Ocak 2005-Ekim 2006 tarihleri arasında 1440 HCV-RNA ve 2754 HBV-DNA testi (Fluorion HCV QNP ve HBV QNP; İontek, Türkiye) sonuçları değerlendirilmiştir.

HCV PCR testinde, İAK yalancı negatif çıkan (211/1440, %14.6) örneklerde lizis ile 121/183 (%66) örnekte, serum dilüsyonu ile 19/28 (%68) örnekte olmak üzere toplam 140/211 (%66) örnekte inhibitörler giderilmiştir. İnhibitör giderme yöntemlerinin kullanımıyla İAK'de yalancı negatiflik oranı HCV PCR testinde %4.9'a (71/1440) düşmüştür. İAK yalancı negatif çıkan hepatit B hasta (15/2754, %0.5) serumlarında dondurup-çözme sonrası 11/15 (%73) örnekte inhibitörler giderilerek sonuç alınmış ve %0.5 oranındaki HBV PCR testi İAK yalancı negatiflik oranı ise %0.1'e (4/2754) düşmüştür.

PCR'de hasta materyallerinden kaynaklanan inhibisyonların %0-8.8 arasında olduğu bildirilmektedir. Bunların tümü İAK yalancı negatifliğinden kaynaklanmakta ve örneklerin dilüsyonu ile bunların önlenilebilir olduğu belirtilmektedir⁶. Bulgularımız, PCR inhibitörlerini gidermede lizis/dilüsyon işlemlerinin etkin olduğunu göstermiştir.

SK tekniğine dayanan DNA izolasyon sistemleri hızlı, uygulaması kolay ve PCR inhibitörlerini yakalamada başarılı bulunmaktadır⁷. Öte yandan MP tekniğinin SK tekniğine göre bazı avantajları göze çarpmaktadır. BioRobot için kullanılan nükleik asit geri kazanım tüpleri vidalı kapaklıdır ve bu PCR karışımının pipetlenmesi aşamasında kapak kontaminasyonundan kaçınmayı kolaylaştırmaktadır. Ayrıca BioRobot ile daha fazla nükleik asit geri kazanım hacmi (75-150 µl) sağlanabilmektedir (bu miktar SK tekniğinde 40 µl'dir). BioRobot ile çalışmada biyogüvenlik kabineye ihtiyaç duyulmaması da sistemin diğer bir avantajıdır⁸.

Rutin PCR laboratuvarlarında, kan örneklerinde inhibitör unsurları gidermede kullanılacak çeşitli teknikler bulunmaktadır. Bu teknikleri, çalışma süresi ve birim maliyet yönünden ele aldığımızda; jel filtrasyonu (30-45 dakika/3.4 euro), silika absorpsiyonu (20 dakika/2.4 euro), afinite pürifikasyonu (23 dakika/4.5 euro) ve iyon değişim kromatografi (~22 dakika/4 euro) teknikleri makul süreli ve hesaplı görünmektedir⁹. Solüsyon temelli (fenol-kloroform tekniği-150 dakika/2 euro) ve manyetik cam partikül izolasyon (90 dakika/14.6 euro) teknikleri süre ve maliyet yönünden elverişli görünmemektedir¹⁰. Otomatik nükleik asit izolasyonu (20 dakika/5.5 euro) tekniği ise manuel olmayışı, hızı ve fazla elution sağlaması yönüyle bu tekniklerin yanında avantajlı görünmektedir¹¹. Dielektroforezis (~10-30 dakika/ticari ürün değeri) tekniği özel donanım ve ekipman gerektirmekte ancak yoğun örnek akışı olan rutin laboratuvarlar için pratik bulunmamaktadır¹².

Sonuç olarak klinik örneklerde bulunabilen PCR inhibitörleri, test maliyet artışına ve sonuçların gecikmesine neden olmakta ve izolasyon tekniklerinin yanı sıra inhibitörlerin giderilmesini gerektirmektedir. PCR inhibitörlerini gidermede lizis/dilüsyon teknikleri İAK performansı üzerinde etkili olmaktadır. Ancak PCR tanı laboratuvarları yine de kendilerine en uygun olan yöntemi seçmelidir.

KAYNAKLAR

1. Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 133-46.
2. Hartman LJ, Coyne SR, Norwood DA. Development of a novel internal positive control for taqman based assays. *Mol Cell Probe* 2005; 19: 298.

3. Hoorfar J, Cook N, Malorny B, et al. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5835.
4. Barkham T. Internal amplification control for PCR should not be mandatory in the clinical medical environment. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3379-80.
5. Wilson G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microb* 1997; 63: 3741-51.
6. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Duchateau V, Scheen R, Crokaert F. Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48: 183-91.
7. Böddinghaus B, Wichelhaus TA, Brade V, Bittner T. Removal of PCR inhibitors by silica membranes: evaluating the amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3750-2.
8. Kishore R, Reef Hardy W, Anderson VJ, Sanchez NA, Buoncristiani MR. Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. *J Forensic Sci* 2006; 51: 1055-61.
9. Kemp BM, Monroe C, Smith DG. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *J Archaeol Sci* 2006; 33: 1680-9.
10. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-4.
11. Nagy M, Otremba P, Krüger C, et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Sci Int* 2005; 152: 13-22.
12. Perch-Nielsen IR, Bang DD, Poulsen CR, El-Ali J, Wolff A. Removal of PCR inhibitors using dielectrophoresis as a selective filter in a microsystem. *Lab Chip* 2003; 3: 212-6.