T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İNSAN ADENOVİRUS DNA'SININ MUTLAK KANTİTASYONU İÇİN DİJİTAL PCR YÖNTEMİNE DAYALI BİR TEST FORMATININ GELİŞTİRİLMESİ

Yağmur Eylül DOĞANTÜRK

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Ocak, 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Yağmur Eylül DOĞANTÜRK

Sevgili aileme ve Prof. Dr. Kenan Midilli'ye ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

İNSAN ADENOVİRUS DNA'SININ MUTLAK KANTİTASYONU İÇİN DİJİTAL PCR YÖNTEMİNE DAYALI BİR TEST FORMATININ GELİŞTİRİLMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 34787

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecim boyunca bilgisini, mesleki tecrübesini, desteğini ve güvenini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya teşekkür ederim.

Bu süreçte bana ilk günden beri destek olan ve tezimin ortaya çıkması ve tamamlanması için gerekli her aşamada bilgisi ve deneyimlerinden yararlandığım hem akademik hem de manevi olarak hayatıma büyük katkısı bulunan, işine verdiği değerle her zaman örnek alacağım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye teşekkür ederim.

Tezimin tüm basamaklarında yanımda bulunan, beni yetiştiren ve tecrübe kazanmamı sağlayan ve manevi desteğini, güvenini, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, kariyerimin mimarları olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK'e, Sayın Prof. Dr. ARİF KAYGUSUZ, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN, Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, Doç.Dr. ERDAL POLAT ve Doç. Dr. A. Suat SARIBAŞ'a teşekkür ederim.

Bu dönemde manevi desteğini esirgemeyen ve katkılarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Devrim SARIBAL ve Uzm. Dr. Yeşim TUYJİ TOK'a,

Hem iyi hem de zor zamanlarında manevi desteklerini esirgemeyen ve bu dönemde beraber çalıştığımız sevgili çalışma arkadaşlarım MSc. Ebru YÜCEBAĞ, MSc. Aylin DAĞ'a,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca yanımda olan yol arkadaşlarım Dr. Harika Öykü DİNÇ, MSc. Okan AYDOĞAN, Dr. Zeynep GÜNGÖRGÜ DALAR, Dr. Zeynep TANER, YLÖ Neşe ARSLAN ve MSc. Yelda İŞLEK'e,

Bu süreçte beraber çalıştığım ve desteklerini esirgemeyen tüm İÜC Covid-19 ve moleküler mikrobiyoloji laboratuvar ekibine,

Son olarak da beni bu günlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Aralık 2022 Yağmur Eylül DOĞANTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xv**
ABSTRACT ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **4**
2.1. Adenovirus 4
2.1.1. Tarihçe 4
2.1.2. Genel Özellikler 4
2.1.3. Yapı ve Replikasyon 7
2.1.4. Patogenez ve İmmünite 13
2.1.5. Epidemiyoloji 14
2.1.6. Klinik Sendromlar 15
2.1.7. Laboratuvar Tanısı 18
2.1.8. Tedavi 22
2.2. Transplant Alıcılarında Adenovirus 22
2.2.1. Transplant Alıcılarında Adenovirusların Tanımlanması ve İzlemi 25
2.3. Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu 27
2.3.1. Dijital PCR Çalışma Prensibi 29
2.3.2. Damlacık Tabanlı Dijital PCR Sistemi 32
2.3.3. Mikroakışkan/Nanoplate Tabanlı Dijital PCR 32
2.4. Bir Laboratuvarda Yeni Geliştirilen Kalitatif ve Kantitatif Testlerin Tanı Kriterleri ... 34

3. YÖNTEM 36
3.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Malzemeler, Kitler ve Sarflar 36
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 36
3.1.2. Primer, Prob ve Kimyasal Malzemeler 37
3.1.3. Kitler 37
3.1.4. Sarf Malzemeler 37
3.2. Yöntem 37
3.2.1. HAdV primer ve prob dizilerinin belirlenmesi, biyoinformatik analiz ve hedef gen dizilerinin tayini 38
3.2.2. Standart HAdV DNA'sının hazırlanması 40
3.2.3. Saflaştırılan DNA'nın ölçümü 41
3.2.4. DNA miktarı bilinen dilüsyonların hazırlanması 42
3.2.5. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması ve Dijital PCR ve Real-Time PCR Testlerinin Gerçekleştirilmesi 44
4. BULGULAR 46
4.1. Çalışma Sonuçları 46
4.1.1. Real-time PCR test sonuçları 46
4.1.2. Dijital PCR test sonuçları 47
4.2. Sonuçların Analizi 51
4.2.1. PCR verimliliği 51
4.2.2. Geliştirilen testin tekrarlanabilirliği ve hassasiyet-prezisyonu 51
4.2.3. Geliştirilen testin doğruluğu 54
4.2.4. Geliştirilen testin dinamik aralığı 54
4.2.5. Analitik duyarlılık (LoD) ve kantitasyon sınırı (LoQ) 54
4.2.6. R kare analizi 55
5. TARTIŞMA 56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
KAYNAKLAR 66
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 90
ETİK KURUL İZİN YAZISI 91
KURUM İZNİ YAZILARI 92
ÖZGEÇMİŞ 93

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1: Adenovirus ve fiberlerin elektron mikroskobu görüntüsü [45] 9

Şekil 2-2: Adenovirus yapısı[46] 10

Şekil 2-3: Adenovirus replikasyonu[50] 11

Şekil 2-4: İnsan adenovirusu şematik genom organizasyonu[53] 12

Şekil 2-5: PCR döngüleri[71] 21

Şekil 2-6: Örnek PCR protokolü[73] 21

Şekil 2-7: EvaGreen çalışma prensibi. PCR reaksiyonu boyunca Taq polimeraz tarafından primer uzaması gerçekleşir. EvaGreen, oluşan çift zincirli DNA molekülüne bağlanır ve floresan ışıma gerçekleşir.[109] 28

Şekil 2-8: Hidroliz probu çalışma prensibi. PCR döngüsü boyunca hem primerler hem de problar hedef diziye bağlanır ve uzama gerçekleşir. Floroforun söndürücü (quencher) ile yakınlığı, floroforun floresan yaymasını önler. Uzama aşamasında, Taq DNA polimeraz enzimi primerin uzamasını sağlar. Taq polimeraz enzimi TaqMan probuna ulaştığında, 5′→3′ ekzonükleaz aktivitesi, floroforu probdan ayırır ve serbest florofordan gelen floresan sinyali ölçülür. Bu sinyal, birikmiş PCR ürününün miktarı ile orantılıdır.[109] 29

Şekil 2-9: Dijital PCR analiz prensibi [110] 30

Şekil 2-10: ddPCR'ın şematik ilüstrasyonu [114] 32

Şekil 2-11: Nanoplate tabanlı dPCR sistemi şematik ilüstrasyonu[119] 33

Şekil 3-1: BLAST ile örnek primer dizilerinin doğrulanması 39

Şekil 3-2: Bioedit yazılımı ile hedef gen dizinin belirlenmesi 40

Şekil 3-3: Real-time PCR için kopya sayısının teorik hesaplanması 42

Şekil 3-4: DNA miktarı bilinen dilüsyonların hazırlanması 43

Şekil 4-1: Real-time PCR test sonuçları (D1: 31; D2: 35; D3: 37; D4: 43; NK: negatif kontrol) 47

Şekil 4-2: Adenovirus dilüsyonlarının ve tekrarlarının dijital PCR sisteminde sonuçları (1) (D1: dilüsyon 1, D2: dilüsyon 2, D3: dilüsyon 3, D4: dilüsyon 4, N/A: mevcut değil, NK: negatif kontrol) 48

Şekil 4-3: Adenovirus dilüsyonlarının ve tekrarlarının dijital PCR sisteminde sonuçları (2) . 49

Şekil 4-4: Adenovirus dilüsyonlarının ve tekrarlarının dPCR sisteminde sonuçları (3)..... 50

Şekil 4-5: qPCR ve dPCR test sonuçlarının karşılaştırılması ve R^2 analizi..... 55

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2-1: İnsan mastadenovirus taksonomisi [32] 5

Tablo 2-2: Adenovirusların sınıflandırılması [29] 6

Tablo 2-3: Adenovirus ile ilişkili hastalıklar [33] 7

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan primer ve prob dizileri[129] 39

Tablo 3-2: Primerlerin ve probun hazırlanması 44

Tablo 3-3: Real-time PCR ve Dijital PCR çalışması için hazırlanan reaksiyon karışımı (1 örnek için)[109,131] 45

Tablo 3-4: Dijital PCR ve real-time PCR çalışmaları için kullanılan ısı profili [109,131] 45

Tablo 4-1: Bütünleşik tablo: Tüm dilüsyonların dijital PCR ile elde edilen kantitatif sonuçları (kopya/µl) 50

Tablo 4-2: Birinci oturum dPCR sonuçlarının test içi analizi 52

Tablo 4-3: İkinci oturum dPCR sonuçlarının test içi analizi 52

Tablo 4-4: Üçüncü oturum dPCR sonuçlarının test içi analizi 53

Tablo 4-5: Tüm testler arası sonuçların değerlendirilmesi 53

Tablo 4-6: Dilüsyonların teorik kopya sayıları, CT değerleri ve dPCR sonuçlarının karşılaştırılması 54

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

µl : Mikrolitre
λ : Lambda
≥ : Büyük eşit
≤ : Küçük eşit

Kısaltmalar **Açıklama**

Adpol : Adenovirus DNA polimeraz
AIDS : Edinilmiş immun yetmezlik sendromu
allo-HSCT : Allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu
APCV : Adenoidal-Faringeal-Konjonktivit Virusu
bo : Bonobo suşu
BOS : Beyin omurilik sıvısı
bp : Baz çifti
CAR : Coxsackie Adenovirus Reseptörü
CD : Başkalaşım kümesi
ch : Şempanze suşu
CMV : Sitomegalovirus
CPE : Sitopatik etki
Ct : Eşik değer döngüsü
cy : Sinomologus maymunu suşu
DBP : DNA bağlayıcı protein
dCTP : Deoksitidin trifosfat
ddPCR : Damlacık tabalı dijital PCR
DNA : Deoksiribonukleik Asit
DNaz : Deoksiribonukleaz
dNTP : Deoksiribonüklozid trifosfat
dPCR : Dijital PCR
DSG : Desmoglein

ECIL : Avrupa lösemi ve infeksiyonlar konferansı
EIA : Enzimimmunoassay
EKC : Epidemik keratokonjonktivit
EM : Elektron mikroskobu
FAdV : Kümes hayvanları adenovirusu
FFPE : Formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş
GIS : Gastrointestinal sistem
go : Goril suşu
HAdV : İnsan adenovirusu
HBV : Hepatit B virusu
HEK : İnsan embriyonik böbrek hücre serisi
HeLa : Servikal kanser hücre serisi
Hep-2 : İnsan epitel karsinoma hücre serisi
HIV : İnsan immun yetmezlik virusu
HSCT : Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
IF : Immunfloresans
ITR : Tersine tekrar dizileri
KB : Keratin oluşturan tümör hücre serisi (HeLa alt ünitesi)
kDa : Kilodalton
KİT : Kemik iliği transplantasyonu
LA : Lateks aglutinasyon
LoD **:** Saptama sınırı
LoQ **:** Kantitasyon sınırı
MCPyV : Merkel hücre polyomavirusu
$MgCl_2$: Magnezyum klorür
ml : Mililitre
mRNA : Mesajcı RNA
NK : Doğal öldürücü
PCF : Faringokonjonktival ateş
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol : Pikomol
pTP : Prekürsör terminal protein
qPCR : Real-time PCR
RB : Retinoblastoma

rh : Rhesus maymunu suşu

RNA : Ribonukleik asit

RNaz : Ribonukleaz

SAdV : Simian adenovirus

sBAR : Tip B adenovirus reseptörü

Taq : *Thermus aquaticus*

Tm : Erime sıcaklığı

TP : Terminal protein

VA : Virus ilişkili

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İNSAN ADENOVİRUS DNA'SININ MUTLAK KANTİTASYONU İÇİN DİJİTAL PCR YÖNTEMİNE DAYALI BİR TEST FORMATININ GELİŞTİRİLMESİ

Yağmur Eylül DOĞANTÜRK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Danışman: Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU

Giriş ve Amaç: İnsan adenovirusu (HAdV) çeşitli hastalıklara, dissemine hastalığa ve primer infeksiyonu takşben çeşitli doku ve organlarda persistans göstererek latent infeksiyona neden olmaktadır. Adenovirus infeksiyonları morbidite ve mortalite ile seyredebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojilerinde en güncel tekniklerden biri çeşitli patojenlerin eş zamanlı tanısı ve mutlak kantitasyonuna olanak sağlayan dijital PCR (dPCR) yöntemidir. Yapılan literatür taramaları sonucunda insan adenovirusunun tüm serotiplerini saptayabilecek ticari bir dPCR kiti bulunmadığı anlaşılmıştır. Bu tez çalışmasında HAdV'nin tüm seroptiplerini düşük kopya sayılarında yüksek duyarlılıkta ve kantitatif bir şekilde saptayabilecek dPCR tabanlı bir test formatı geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada kullanılan primer ve prob dizileri literatür taramaları sonucunda tüm adenovirus türlerini tek seansta saptayabilecek şekilde seçildi. Seçilen diziler nBLAST ile doğrulandı ve BioEdit yazılımı aracılığı ile hedef dizi belirlendi. Çalışmada kullanılan standart HAdV DNA'sı, adenovirus pozitif olduğu bilinen arşivlenmiş ekstraksiyonların hekzon gen

bölgesinin real-time PCR yöntemi ile klonlanarak manyetik boncuklarla izole edilmesiyle elde edilmiştir. İzole edilen bölgeler master stok solüsyonu olarak kullanılmak üzere havuzlanarak çalışılmıştır. Stok solüsyondaki DNA konsantrasyonu qubit florometre ile ölçülmüştür. Deneyde kullanılmak üzere insan adenovirusu hekzon bölgesine ait hedef bölge izole edilerek çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeden stok oluşturularak DNA konsantrasyonu qubit florometre ile ölçüldü ve ana stok olarak arşivlendi. Florometrede ölçülen DNA konsantrasyonu ve çoğaltılan baz dizisinin uzunluğundan yararlanılarak, ana stoğun olarak mililitredeki kopya sayısı tahmini olarak 7,634x1011 kopya/ml olarak hesaplandı. DNA miktarı belirlenen stok onar kat sulandırılarak ardışık 10 dilüsyon serisi hazırlandı. Bu dilüsyonlar içinde DNA kopya sayılarının yaklaşık 76.340 kopya/ml, 7.634 kopya/ml, 763,4 kopya/ml ve 76,34 kopya/ml olduğu tahmin edilen ardışık son 4 dilüsyon seçildi ve çalışıldıTestin dinamik aralığını, saptama sınırını (LoD), ölçüm limitini (LoQ), kesinlik ve tekrarlanabilirliğini tayin edebilmek amacı ile ardışık dört dilüsyon, birbirinden bağımsız üç oturumda, üçer tekrarlı olarak çalışıldı.

Sonuç: Testin dinamik aralığı 770,4 - 0,9476 kopya/µl, saptama sınırı (LoD) ve kantifikasyon sınırı (LoQ) eşit 0,9476 kopya/µl ve R^2 değeri %99,44 olarak belirlendi.

Tartışma: Elde edilen sonuçlar, insan adenovirusunun dPCR yöntemi ile tanısı ve mutlak kantitasyonu için iyi bir araç olabileceğini göstermektedir. Yöntemin tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi ve sahaya valide edilebilmesi için testin farklı laboratuvatalara adapte edilmesi ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Aralık 2022 , 112 sayfa.

Anahtar kelimeler: adenovirus, HAdV, dijital PCR, dPCR

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

DEVELOPMENT OF DIGITAL PCR BASED TEST METHOD FOR ABSOLUTE QUANTIFICATION OF HUMAN ADENOVIRUS DNA

Yağmur Eylül DOĞANTÜRK

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Microbiology

Microbiology Programme

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU

Background and objective: Human adenovirus (HAdV) cause various infections, disseminated disease and also causes latent infection by persisting various tissues and organs following primer infection. HAdV infections can be resulted with morbidity and mortality. One of the up-to-date techniques in Polymerase Chain Reaction (PCR) technology is digital PCR (dPCR) assay which enables detection and absolute quantification of diverse pathogens simultaneously. As a result of literature review, we noticed that there is no commercial kit detecting HAdV for dPCR system. The aim of the present study was to develop a highly sensitive test format based on dPCR that able to quantitative detection of all serotypes of HAdV in low copy numbers.

Materials and method: The primer and probe sequences used in the study were designated through the literature review so that they could detect all HAdV serotypes in a single run. The selected primers were verified with nBLAST and the target sequence was determined using the BioEdit software. The standardized HAdV DNA to be used in the experiment was prepared

from HAdV positive extractions archived in our laboratory and hexon gene region was cloned by real-time PCR, isolated using magnetic beads. Isolated gene regions were pooled as a master stock solution for later use. DNA concentration of the stock solution was measured by qubit fluorometer. The estimated copy number of the stock solution per milliliter was calculated as 7,634x1011 copies/ml based on the length of the amplified base sequence and fluorometer measurement. Ten consecutive tenfold dilution was prepared by diluting the master stock and the out of ten dilutions, the last four dilutions were selected which contains estimated 76.340 cp/ml, 7.634 cp/ml, 763,4 cp/ml and 76,34 cp/ml HAdV DNA. In order to determine the dynamic range, limit of detection (LoD), limit of quantification (LoQ), precision and reproducibility of the test, four consecutive dilutions were studied in triplicate in three independent runs.

Results: The dynamic range of the test was found from 770,4 to 0,9476 cp/µl, limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) values were the same 0,9476 cp/µl. R^2 value was %99,44.

Conclusion: The results show that digital PCR method can be a good tool for the diagnosis and absolute quantification of human adenoviruses. In order to determine reproducibility of the test and validate the method in the field, it needs to be developed and adapted in laboratories and supported by clinical studies.

December 2022, 112 pages.

Keywords: adenovirus, HAdV, dijital PCR, dPCR

1. GİRİŞ

İnsan adenovirusu (HAdV), zarfsız, çift iplikli bir DNA virusu olup, genellikle yıl boyunca gözlenen, mevsimsel dağılım göstermeyen ve kendini sınırlayan solunum sistemi infeksiyonları, gastrointestinal sistem infeksiyonları, konjonktivit ve menenjite neden olmaktadır. HAdV infeksiyonları her ne kadar kendini sınırlamaktaysa da özellikle çocuklarda, toplu yaşam alanlarında (okul, askeriye vb.) ve immun yetersiz kişilerde en sık gözlenen infeksiyonlardan biridir ve bu topluluklarda yüksek mortalite ile ilişkilidir. Kişiden kişiye bulaş; aerosollerin solunmasıyla, direkt konjonktival inokulasyon ile, fekal-oral yayılım ile veya infekte doku veya kana direkt temas ile gerçekleşmektedir.[1–3] İnfeksiyon genellikle asemptomatik seyretse de kolit, pnömoni, hepatit, nefrit hemorajik sistit, konjonktivit, ensefalit ya da çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanabilmektedir.[4]

Yapılan çalışmalar, sistemik HAdV infeksiyonu geçirmiş olan hastaların neredeyse tamamında klinik semptom olsun ya da olmasın, dışkıda HAdV'nin saptanabilir düzeylerde olduğunu göstermiştir. Bu da virus yayılımında gastrointestinal sistemin yaygın bir rolü olabileceğini göstermektedir.[5] Özellikle çocuklarda primer infeksiyonu takiben, çeşitli dokularda persistans göstererek latent infeksiyona neden olmakta ve immun sistemin baskılanması ile reaktive olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda kemik iliği transplantasyonu alıcısı olan pediatrik hastaların %31'inde, gastrointestinal dokudan HAdV izole edilmiş ve en yüksek prevalansın terminal ileum olduğu gösterilmiştir. İn situ hibridizasyon çalışmaları ile HAdV'nin, lamina proprianın lenfoid hücrelerinde persistans gösterdiği tespit edilmiştir. İmmün yetersiz çocuklarda infeksiyon komplikasyonlarının merkezi gastrointestinal sistemde HAdV persistası olarak gösterilirken, intestinal lenfoid hücreleri, HAdV persistansı ve reaktivasyonun gerçekleştiği rezervuar görevi görmektedir. İntestinal epitelyal hücreler ise viral proliferasyonun gerçekleştiği ve infeksiyonun yayıldığı ana kaynak olarak gösterilmiştir. Bu bulgular, hayatı tehdit edici invaziv HAdV infeksiyonunda önemli etkenler olarak değerlendirilir.[6]

Adenovirus infeksiyonları, kemik iliği transplantasyon (KİT) alıcısı olan kişilerde morbidite ve mortalite ile seyredebilmektedir. İnfeksiyon sıklığı yetişkinlerde %3-15 oranında görülürken, pediatrik alıcılarda %6-42 oranında görülmektedir.[7] HAdV, özellikle pediatrik

kök hücre transplantasyon alıcılarında ciddi komplikasyonlara sebep olabilmektedir.[8,9] Periferal kan örneğinde HAdV saptanan pediatrik KİT alıcılarının %82'sinde, infeksiyon mortalite ile sonuçlanmaktadır.[10] Hem kemik iliği hem de organ transplantasyon alıcılarında, transplantasyon sonrası erken evrede, aktif hastalık ve asemptomatik viremi geliştiği kanıtlanmıştır ve bunun hastaneye bağlı bir salgın nedeniyle kaynaklandığına dair bir kanıt bulunamamıştır. İnfeksiyon kaynağının; alıcıdaki latent adenovirusun reaktivasyonu ile mi (immunsupresif tedaviye maruz kalınması sonucu) ya da donör kaynaklı mı gerçekleştiği henüz anlaşılamamıştır.[10–13] Yapılan çalışmalarda immunsupresyon tedavisi sonucunda düşen interferon düzeylerinin, HAdV reaktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir[14]. Aynı zamanda transplantasyon sonrası kemoterapötik ilaçlar ile immunsupresyon tedavisinin, interferon gama için anahtar rol oynayan T hücreleri ve NK (doğal öldürücü) hücrelerinin sayısında da azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.[15–17]

Bu doğrultuda, özellikle pediatrik kemik iliği transplantasyon alıcılarında, transplantasyon sonrası kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle HAdV monitörizasyonu önemle tavsiye edilmektedir. Transplantasyon alıcılarının dışkı ve kan örnekleri, transplantasyon öncesinde ve transplantasyonun ardından takip eden 100 gün boyunca kantitatif olarak izlenmelidir. Bu süre içerisinde HAdV viral yükünün ≥1000 kopya/ml olarak saptanması, hem hastalığın seyri, hem de bulaşı açısından tehlike oluşturmaktadır ve önlem alınması gerekmektedir.[18–20]

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) keşfedildiğinden beri hastalıkların moleküler tanısında, patojenlerin ve onkojenlerin tanımlanmasında önemli bir role sahip olmuştur. Geçtiğimiz 30 yıl içinde PCR teknikleri gelişmiş ve daha duyarlı ve çoklu tanımlamaya elverişli hale getirilmiştir. PCR teknolojisinde en güncel tekniklerden biri de farklı patojenlerin eş zamanlı mutlak kantitasyonuna olanak sağlayan dijital PCR (dPCR) yöntemidir. Bu yöntemde DNA kalıpları, amplifikasyonun ilk aşamasında her bir reaksiyon bölmesinde 0-3 adet DNA kalıbı olacak şekilde bilinen konsantrasyonlara dilüe edilir. DNA kalıpları ayrı mikro/nano litre hacim düzeyindeki partisyonlara ayrılır ve bu partisyonlarda amplifikasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi, hedef yükün düşük olduğu durumlarda bile saptanabilmesini sağlar ve bu da testin duyarlılığını arttırır. Amplifikasyon ürünleri her bir partisyonda floresan probların veya floresan boyaların kullanılmasıyla saptanır. Böylece yalnızca hedef DNA'nın bulunduğu partisyonlarda pozitif reaksiyon gerçekleşir ve pozitif sinyalin saptandığı bölmelerin sayısı herhangi bir çapraz reaksiyona olanak vermeden, mutlak kantitasyon sağlar. Sonuç olarak

dPCR, konvansiyonel PCR yöntemine kıyasla daha duyarlı, pek çok patojeni veya tek bir patojenin farklı alt türlerini tek bir seansta tanımlamaya ve mutlak kantitasyona elverişli bir yöntemdir.[21]

Bu bilgiler ışığında; pediatrik kemik iliği transplantasyonu alıcılarında ve diğer primer ve sekonder immun yetmezliği olan kişilerde (transplantasyon sonrası immunsupresif tedavi, otoimmun hepatitler, AIDS vb.) önemle önerilen HAdV'nin mutlak kantitasyonunun izlemini sağlamak ve gastrointestinal sistemdeki persistansını saptamak amacıyla yüksek duyarlılıkta bir teste gereklilik olduğu düşünülmüştür. Yapılan literatür taramaları sonucunda, adenovirusun tüm tiplerini yüksek özgüllük ve duyarlılıkta saptayacak, dPCR sistemi için valide edilmiş ticari bir dPCR kiti bulunmamaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında adenovirusun tüm tiplerini yüksek duyarlılıkta kantitatif olarak saptayabilecek Dijital PCR yöntemine dayalı bir test formatı geliştirmesi hedeflenmektedir.

Bu tez çalışmasında HAdV'nin tüm tiplerini yüksek duyarlılıkta kantitatif olarak saptayabilecek dijital PCR yöntemine dayalı bir test formatı geliştirilmiştir. Geliştirilen bu test ile primer ve sekonder immun yetmezliği olan kişilerde HAdV'nin yüksek duyarlılıkta tanımlanması, özellikle çocuklarda kemik iliği ve organ transplantasyon alıcılarında klinik örneklerde hastalığın persistansı ve seyrinin izlemi açısından önerilen kantitatif monitörizasyonun sağlanması, bu sayede alınacak önlemler ve tedavi seyrine katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Adenovirus

2.1.1. Tarihçe

İlk olarak 1948 yılında köpeklerde ciddi infeksiyon hastalıkları ve salgınlara neden olmasıyla ön plana çıkan bu virus, aynı yıl Rubarth tarafından tanımlanmış ve "İnfeksiyöz Köpek Hepatiti (Rubarth hastalığı)" olarak isimlendirimiştir.[22,23] Sonrasında Wallace Rowe ve ekibi 1953 yılında yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında insan adenoid dokularının spontan dejenerasyonunu stimüle eden bir ajan saptamışlardır ve "sitopatojenik ajan" olarak isimlendirmişlerdir.[24] Virusun insanda adenoid dokularda, farinkste ve konjonktivada infeksiyon etkeni olduğunun saptanmasıyla 1955 yılında "Adenoidal-Faringeal-Konjonktivit Virusu (APCV)" olarak isimlendirilmiş[25] ve 1956'da ilk izole edildiği dokuya ithafen ismi "İnsan Adenovirusu (HAdV)" olarak değiştirilmiştir.[26]

2.1.2. Genel Özellikler

Adenoviruslar, insan ve hayvanlarda infeksiyona eden olan ve doğada çok yaygın olarak bulunan viruslerdir.[27] *Adenoviridae* ailesinde 5 cins yer almaktadır. Bunlar; *Atadenovirus, Aviadenovirus, Ichtadenovirus, Mastadenovirus* ve *Siadenovirus*'tür.[28] Bu ailedeki tüm cinsler aynı yapıda, aynı büyüklüktedirler ve aynı polipeptid içeriğine sahiptirler.[27] HAdV; solunum yolu infeksiyonları, faringokonjonktivit, hemorajik sistit ve gastroenterite neden olan bir DNA virusudur. HAdV keşfedildiğinden bu yana yaklaşık 100 serotipi tanımlanmıştır ancak bunlardan bilinen 54 tanesi insanlarda infeksiyona neden olmaktadır. Bu serotipler serolojik özellikleri, hemaglutinasyon özellikleri, kemirgenlerdeki onkojenik potansiyelleri, biyokimyasal, immunolojik ve biyolojik özelliklerine göre 7 gruba (A'dan G'ye) ayrılmıştır. Sonrasında grup B ise tropizm özelliklerine göre alt gruplara ayrılmıştır (tablo 2-1).[29] Bu gruplardan DNA'daki guanin-sitozin oranı en düşük olan %49'luk oranla grup A adenoviruslardır. Grup A HAdV'nin aynı zamanda bazı hayvan modellerinde hücre büyümesini baskılayan retinoblastoma (RB) ve p53 genlerini baskılayarak yoğun hücre proliferasyonuna neden olduğu ve onkojenik özellik gösterdiği bildirilmiştir.[30,31]

Tablo 2-1: İnsan mastadenovirus taksonomisi [32]

Human Mastadenovirus	
Türler	***Genotip***
Human mastadenovirus A	HAdV-12, 18, 31, ch1
Human mastadenovirus B	HAdV-3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, simian AdV-21 (SAdV-21ch), 27–28ch/go, 29ch, 32–33ch, 35bo/ch, 41go, 46–47go
Human mastadenovirus C	BAdV-9, HAdV-1, 2, 5, 6, SAdV-31ch, 34ch, 40ch, 42bo, 43go, 44bo, 45go
Human mastadenovirus D	HAdV-8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, +23 genotip
Human mastadenovirus E	HAdV-4, SAdV-22–26ch, 30ch, 36ch, 37bo/ch, 38–39ch
Human mastadenovirus F	HAdV-40, 41
Human mastadenovirus G	HAdV-52, SAdV-1cy, 2rh, 7rh, 11–12rh, 15rh, 51–53rh

ch, Şempanze suşu; bo, Bonobo suşu; SAdV, Simian adenovirus; go, goril suşu, cy, sinomologus maymunu suşu; rh, rhesus maymunu suşu

Tablo 2-2: Adenovirusların sınıflandırılması [29]

Tür	Serotip	Yaptığı infeksiyon	Reseptör	Hayvanlarda tümör yeteneği
A	12, 18, 31	GIS$^{\alpha}$, Solunum	CAR$^{\beta}$	Yüksek
B1	16, 21, 34, 35, 50	Solunum, oküler, üriner sistem	CD46	Zayıf
B2	3, 7, 14		Desmoglein-2	Zayıf
B3	11		CD-46, DSG-2	Zayıf
C	1, 2, 5, 6	Üst solunum yolu	CAR	Düşük
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54	Oküler, GIS	CAR, Sialik asit (8, 9, 37)	Düşük
E	4	Solunum	CAR	Düşük
F	40, 41	GIS	CAR	Düşük
G	52	GIS	Bilinmiyor	Düşük

α: Gastrointestinal

β: Coxsackie–adenovirus receptor

Tablo 2-3: Adenovirus ile ilişkili hastalıklar [33]

Hastalık	Serotip	Hasta grubu
Solunum Hastalıkları		
Ateşli üst solunum yolu infeksiyonu	1, 3, 5, 7, 14, 21, etc.	Yeni doğan, küçük çocuklar
Faringokonjonktival ateş	1, 2, 3, 4, 5, 7	Çocuk, genç
Akut respiratuar hastalık	1, 2, 4, 5, 6, 7, 14, 21	Yeni doğan, genç çocuklar, askeri birlikler
Pertusis benzeri sendrom	5	Yeni doğan, küçük çocuklar
Pnömoni	3, 4, 7, 14, 21, 30	Yeni doğan, küçük çocuklar, askeri birlikler, immun yetersiz hastalar
Diğer Hastalıklar		
Akut hemorajik sistit/nefrit	11, 21	Çocuklar, immun yetersiz hastalar
Epidemik keratokonjonktivit	8, 9, 11, 19, 35, 37	Her yaş insan
Gastroenterit	40, 41	Yeni doğan, küçük çocuklar, immun yetersiz hastalar
Hepatit	1, 5, 7, 31	İmmun yetersiz hastalar
Meningoensefalit	2, 7	Çocuklar, immun yetersiz hastalar

2.1.3. Yapı ve Replikasyon

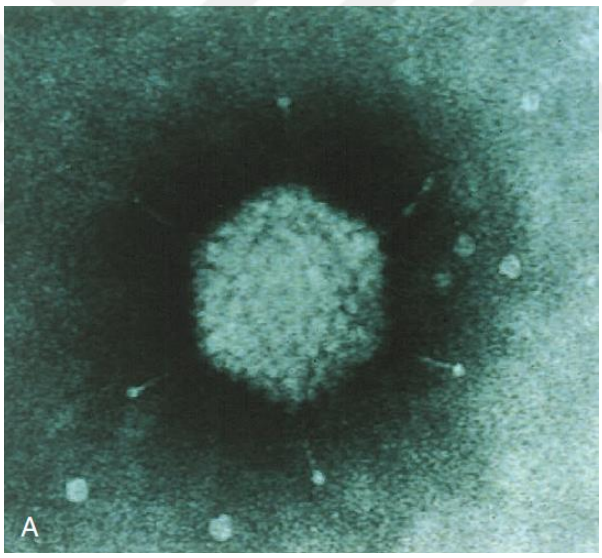
Adenoviruslar 26-45 kilobazlık ve 30-40 gen kodlama kapasitesinde, lineer çift iplikli DNA'ya sahip, zarfsız viruslardır. Adenovirus genomunun her iki ucunda, DNA replikasyon

orijini olarak fonksiyon gösteren 150 baz çifti (bp) uzunluğunda tersine tekrar dizileri içeren (ITR) bölgeler bulunmaktadır. Bu diziler ayrıca tek iplikli lineer DNA'nın sirküler çift iplikli DNA formunun oluşumunu sağlamaktadır.[34] Virusun büyüklüğü serotipe göre değişmekle beraber, çift iplikli DNA'sının her bir 5' ucunda kovalent olarak bağlanmış, moleküler kütlesi 55 kilodalton (kDa) olan bir terminal protein (TP) bulunmaktadır. Nükleotid G+C içeriği %33,24-%66,92'dir. Genomun merkezi bölgesinde genetik organizasyon tüm ailede korunmuş olmakla beraber, distal kısımlar uzunluk ve gen bölgeleri açısından farklılık göstermektedir. İkozohedral simetri gösteren adenoviruslar 70-90 nanometre (nm) çapında olup, 252 kapsomerden oluşan kapsite sahiptir. Bu kapsomerden eşkenar üçgen yüzleri oluşturanlar "hekzon", köşeleri oluşturan 12 adet kapsomer ise "penton baz" olarak isimlendirilir. Bu penton baz bölgelerinden 9-77,5 nm uzunluğunda "fiber" denilen uzantılar çıkmakta ve bu uzantılar "viral yapışma proteinleri"ni içermektedir. Bu proteinler sayesinde adenoviruslar immunoglobulin süperailesinin bir üyesi olan Coxsackie Adenovirus Reseptörü (CAR) ile etkileşerek hücreye bağlanır ve pinositoz yoluyla hücreye girer.[27,31–33] Bazı adenoviruslar hücreye giriş için bir membran kofaktörü olan CD46 reseptörünü ve/veya bir hücre adezyon proteini olan desmoglein 2 (DSG2) reseptörünü kullanmaktadır.[35–37] Adenovirus B türü ise sBAR (Tip B adenovirus reseptörü) reseptörünü, HAdV 8, 19, 37 ve beraberinde bazı tipler de sialik asit reseptörlerini kullanmaktadırlar. Adenovirus penton proteinleri, hücredeki integrinlerle etkileşime girerek virusun hücre içine girişine katkıda bulunur.[38,39]

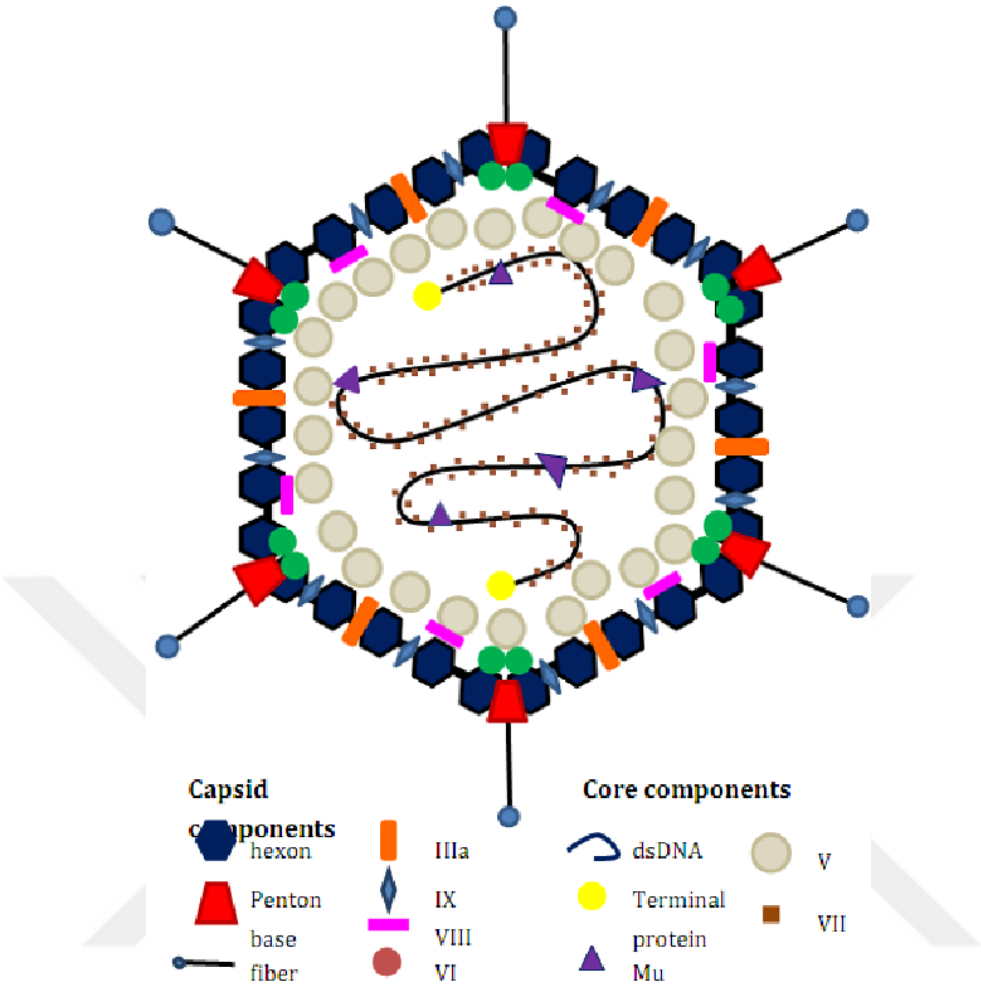
Major kapsomer olan hekzonlar, polipeptit II olarak adlandırılan 3 özdeş polimerin etkileşimi ile oluşmaktadır. Her bir hekzon 2 karakteristik kısımdan oluşmaktadır: Uç kısımları üçgen şeklinde 3 tepecik ve merkezi kaviteli psödoheksogonal taban. *Mastadenovirus* cinsine ait üyelerde, kapsitin dış kısmında polipeptit IX konumlanmaktadır. Bu polipeptit, toplamda 12 kopya olmak üzere hekzonun her bir yüzünde bulunmakta ve bu yüzleri bir arada tutmaktadır. Minör kapsit proteinleri olan IIIa, VI ve IX, hekzon kabuğun ve tüm viryonun tamamının stabilizasyonunu sağlamaktadır ve konak hücreye girişin ardından endozom penetrasyonu, transkripsiyonal olaylar ve hücresel organizasyon (protein IX) aşamalarında rol oynamaktadır.[40,41] Protein VI, mikrotübüllerden nükleer porlara giden aracılı transporta imkan sağlar ve endozomlardan viryon salınımına aracı olur. Pentonlar, 5 kopya polipeptit III'ün etkileşimi ile oluşmakta ve bir, iki veya üç adet fiberle sıkıca bağlıdır. Fiberler polipeptit IV'ün homotrimerleridir ve kuyruk, şaft ve distal topuz olmak üzere üç yapısal bölümden oluşmaktadır. Kapsitin kor bölgesinde bulunan protein V, VII, X ve terminal proteinler, virusa

ait viral DNA'nın konak hücre DNA'sına transportunu kolaylaştırmada rol oynamaktadır.[32,42,43] Polipeptit V yalnızca mastadenoviruslarda bulunmaktadır. Adenoviruslar zarfsız yapıları nedeniyle dondurulmaya, sıcağa ve yağ çözücülere dayanıklılıdır.[32]

Adenovirusların hekzon bölgesi tüm insan adenovirusları için ortak antijenik bölgeler içerir ancak üzerinde yer alan ve epsilon adı verilen bir epitop nötralizan antikorları indükleyen tipe özgü spesifik bölgeler içermektedir. Fiber antijenleri hemaglutinasyonda rol oynar ve tipe özgü olduğundan serotiplendirmede kullanılmaktadır. Penton bazları ise grup reaktif antijenik özellik göstermekle beraber, toksin benzeri aktivite göstermektedir ve hücrelerde sitopatik etkinin (CPE) oluşmasında rol oynar. Bu sitopatik etki konak hücrelerinin yuvarlaklaşarak üzüm salkımına benzer bir yapıda kümeleşmesine neden olur ki, bu da adenovirusa özgü bir etkidir. Fiberler ve penton bazları adenoviruslara özgü kapsomer yapısını oluşturmanın yanı sıra, hücre için toksiktir.[39,44]

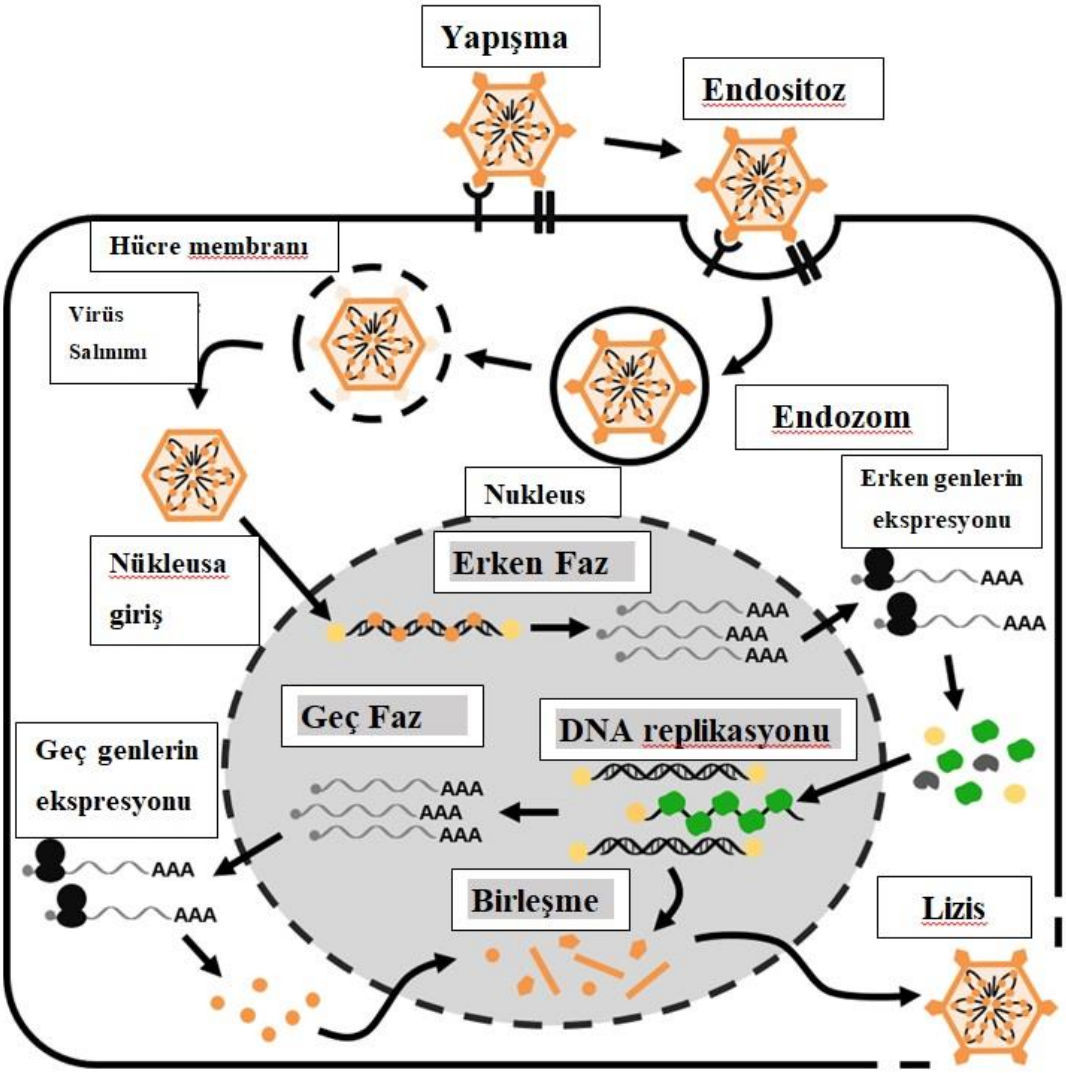


Şekil 2-1: Adenovirus ve fiberlerin elektron mikroskobu görüntüsü [45]



Şekil 2-2: Adenovirus yapısı[46]

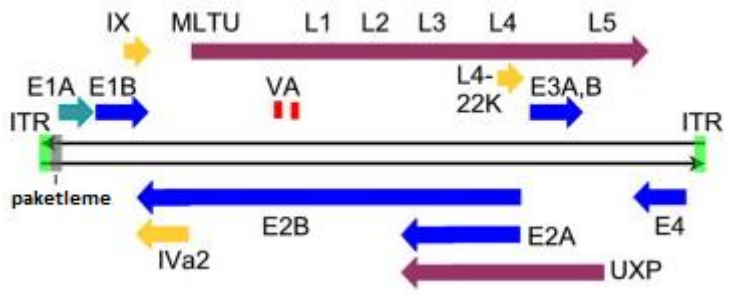
Adenoviruslar yalnızca epitelyal kökenli hücrelerde iyi şekilde çoğalabilirler. Çoğu DNA virusu gibi adenoviruslar da viral DNA polimeraz sayesinde çekirdekte replike olmaktadır. Fiber ve pentonlar ile konak hücreye tutunan virus endozom içinde konak hücre içine alınır ve endozomlardaki asidik pH etkisiyle kapsit sitoplazmaya doğru hareket eder. Sitoplazmaya bırakılan kapsit içindeki DNA da mikrotübüller tarafından çekirdeğe taşınır ve burada DNA kapsitten ayrılır. Virusun replikasyonu iki ayrı safhada gerçekleşir: Erken ve geç olaylar. Erken genler döngü replikasyon döngüsü boyunca devam ederken, geç genler DNA sentezinden sonra aktive olur. Erken safha virus replikasyonu için uygun şartların sağlanmasını ve viral replikasyonun başlamasını temsil etmektedir. Bunun için konak hücrenin S fazına geçişi indüklenmektedir. İn-vivo çalışmalar göstermiştir ki; erken safhada oluşturulan viral ürünler biriktiğinde infekte olmuş hücre S fazına başlarken viral DNA replikasyonu da başlamaktadır ve infekte hücrenin savunma mekanizması inhibe edilmektedir.[30,47–49]



Şekil 2-3: Adenovirus replikasyonu[50]

Adenovirus serotipleri genomik açıdan benzer yapısal organizasyon göstermektedir ve erken gen bölgesi, ara gen bölgesi, geç gen bölgesi ve infeksiyonun ileri safhalarında sentezlenen U ekzon protein olmak üzere 4 düzenleyici bölge içermektedir. Adenovirus DNA'sının her iki zincirinde toplam 7 adet erken transkript bulunmaktadır. Erken gen bölgesi E1'den E4'e kadar isimlendirilmiş 4 transkripsiyon ünitesi içermektedir. Bu genler viral replikasyon için zorunlu genlerdir. Bunların arasında E3 transkripsiyon ünitesi HAdV serotipleri arasında yüksek oranda farklılık göstermektedir ve konak immun yanıtı tetikleyen proteinler kodlamaktadır. Ara gen bölgesi ise 2 transkripsiyon ünitesi içermektedir: IX ve IVa2. Geç gen bölgesi ise L1'den L5'e kadar isimlendirilmiş olan 5 transkripsiyon ünitesi içermektedir. Bu gen bölgesi DNA sentezi başladıktan sonra olgun viryonda bulunmaktadır.[42]

Çoğu Adenovirus transkripsiyon ünitesi RNA polimeraz II tarafından transkripte edilmektedir ve alternatif uç uca ekleme (alternative splicing) veya alternatif poly(A) bölgeleri sayesinde farklılaşmış mesajcı RNA (mRNA)'ların çoğalmasını sağlar. Çoğu durumda bu transkripsiyon üniteleri birden fazla fonksiyonel protein kodlayabilmektedir. Çok az sayıda virus ile ilişkili (VA) RNA, RNA polimeraz III tarafından transkripte edilse de, protein kodlanmamaktadır.[51] Adenovirus tarafından infekte olmuş hücrelerde viral DNA replikasyonunda görev alan 20'den fazla erken protein sentezlenmektedir. Bu proteinlerin çoğunluğu yapısal olmamakla birlikte, bu proteinleri kodlayan genlerden en önemlisi E1A genidir. Ayrıca bu gen bölgesi, diğer erken gen bölgelerinin transkripsiyonu için de zorunludur. Bir diğer erken gen ise E1B genidir ve kodladığı protein sayesinde konak hücrenin apoptoza gitmesini inhibe eder. E1A proteini hücre büyümesini baskılayan p105RB'ye (retinoblastoma gen ürünü) bağlanırken; E1B proteini de yine hücresel büyümeyi baskılayan p53 proteinine bağlanarak hücrenin apoptoza gitmesine engel olur; kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasına, dolayısıyla da onkojenik transformasyona neden olur. Bu sayede konak hücre içinde viral replikasyon kolaylaşmış olur ve bu durum hücre ölümüyle sonuçlanır. Nonpermisif hücrelerde virus genomu nukleusta kalır ve virus latent hale geçer.[52]



Şekil 2-4: İnsan adenovirusu şematik genom organizasyonu[53]

Genom repliksyonu, E2 transkripsiyon bölgesi tarafından kodlanan prekürsör terminal protein (pTP), Adenovirus DNA polimeraz (Adpol) ve DNA bağlayıcı protein (DBP) olarak adlandırılan 3 farklı viral proteinin kombine aktivasyonu ile tamamlanır.[54] Adenovirus replikasyonunda pTP primer olarak rol oynar ve DNA sentezi başlar. DNA sentezi başladıktan sonra geç genler (L) tarafından yapısal proteinler kodlanmaya başlar. Oluşturulan tek büyük transkriptten "splicing" ile 18 farklı geç mRNA transkripti meydana getirilir. Viral protein

sentezi sitoplazmada gerçekleşeceğinden, bu viral proteinler sitoplazmaya taşınır. Oluşan kor proteinleri ve DNA, kapsomerlerin bir araya gelerek oluşturdukları boş kapsitten içeri girer ve defektif partiküller inklüzyon cisimlerini oluşturur. Oluşan çok sayıda virus hücre lizisi ile hücre dışına çıkar ve komşu hücrelere yayılır.[30,52]

2.1.4. Patogenez ve İmmünite

Adenoviruslar infekte ettikleri hücrelerde kendi yapısal proteinlerini kodlarlar ve konak hücrenin mRNA üretimini baskılarlar. Bunun sonucunda üretilen viral proteinler konak hücre çekirdeğinde birikir ve inklüzyon cisimcikleri oluşur. Oluşan inklüzyon cisimcikleri sitomegalovirusun (CMV) neden olduğu inklüzyon cisimciklerine benzese de farklı olarak adenovirus infeksiyonlarında sinsisyumlar oluşmaz. Ek olarak infeksiyon bölgesinde epitelyal hücre nekrozu ve nükleer hücre infiltrasyonu görülmektedir.[30,31,55]

Adenoviruslar mukoepitelyal hücrelerde litik, lenfoid ve adenoid hücrelerde, tonsillerde ve payer plaklarında latent infeksiyon ve farelerde transforme edici infeksiyon oluştururlar. Litik infeksiyonda her bir konak hücre içinde 10^4-10^6 arasında, içlerinden %1-5'i infeksiyöz olan yeni viruslar üretilir ve sonucunda hücre ölümü gerçekleşir. Latent infeksiyonda, litik infeksiyonda olduğunun aksine, fazla sayıda virus üretilmediğinden hücre ölümü gerçekleşmez, virus hücrelerde latent ve persistan olarak kalır. Ancak immun sistemi baskılanmış hastalarda (solid organ transplant alıcılarında, kemik iliği transplant alıcılarında, AIDS vb.) virus reaktive olarak litik infeksiyona neden olabilir. Onkojenik adenoviruslar ise konak hücre DNA'sına entegre olur ve replikasyona devam eder. Ancak infeksiyöz viryon üretmezler. Adenovirus tip 12, 18 ve 31 başta olmak üzere bazı adenovirus tipleri, yeni doğan farelerde tümör oluşturma yeteneğindedir. Ek olarak adenoviruslar, bu onkojenik özelliklerinden bağımsız bir şekilde in-vivo hücre kültüründe de hücre transformasyonu gerçekleştirmektedir. Bu özelliği adenovirusların laboratuvarda tanımlanmasına yardımcı olur. İnsan adenoviruslarında transforme edici genler E1A ve E1B gen bölgesinde bulunmaktadır, ancak sıçanlarda tümör oluşturması için E4 gen bölgesinin aktivasyonu gereklidir.[30,31,56]

Adenoviruslar bölgesel lenf düğümleri ile gastrointestinal sistemdeki lendfoid hücreleri infekte eden bir virus olduğundan, diğer solunum yolu viruslarına bağlı infeksiyonlarda olduğunun aksine, adenoviruslara karşı gelişen bağışık yanıt etkili ve uzun sürelidir. Hastalıktan korunmada doğal bağışıklık önemli bir rol oynamaktadır. Savunmada hücresel ve humoral yanıt

etkili olmakla birlikte, humoral yanıt daha kritik bir rol oynamaktadır. Antikor yanıtı adenovirus infeksiyonlarının iyileşmesinde ve aynı serotip ile gerçekleşebilecek tekrarlayabilecek hastalıklara karşı korumada etkilidir, ancak farklı serotiplere karşı etkisi yoktur. Klinik hastalığa karşı bağışıklık hayat boyu devamlı olan nötralizan antikorlar sayesinde gerçekleşir. Ancak nötralizan antikorlar serotipe özgü olduğundan farklı serotipler ile yinelenen infeksiyonlara karşı bir koruyuculuğu bulunmamaktadır. Serotipe özgü olarak gelişen antikorların yanında çoğu hastada gruba özgü antikor yanıtı da gelişir. Gruba özgü antikorlar zamanla azalmaktadırlar ve infeksiyona karşı koruyucu özellikleri yoktur ancak adenovirus infeksiyonlarının laboratuvar tanısında yardımcı test olarak kullanılırlar.[31],[55] Adenovirus infeksiyonlarında hücresel immun yanıtın rolü ise konak hücre içinde virus replikasyonunu sınırlandırmaktır.[30]

2.1.5. Epidemiyoloji

Adenoviruslar tüm çıplak viruslar gibi kuruluğa; asit, proteaz ve safra gibi gastrointestinal sistem salgılarına ve klora dirençlidir. Bulaş aerosollerle, kontamine su ve malzemelerle, fekal-oral yolla, yeterince klorlanmamış havuzlar aracılığıyla ve kontamine oküler araçlarla gerçekleşir. Çocukluk çağında bulaş primer olarak solunum yoluyla gerçekleşirken, hayatın ilerleyen zamanlarında gastrointestinal sistem yoluyla etrafa yayılır. Dışkı ile yayılımın, infeksiyon sonlandıktan sonraki 30 aya kadar devam edebildiği bildirilmiştir. İnfeksiyon asemptomatik olarak geçiriliyor olsa bile dışkı ile virus salınımı gerçekleşmektedir. Adenoviruslar dünyada her bölgede bulunurlar ve mevsimsel dağılım göstermezler. Bahar ve kış aylarında ağırlıklı olarak solunum yolu infeksiyonlarına neden olurken, yaz aylarında yüzme havuzu kullanımına bağlı olarak konjonktivite ve de her dönemde gastrointestinal infeksiyonlara neden olmaktadırlar. Genellikle toplumsal salgınlara neden olmasalar da; okul, kışla, huzurevi gibi yakın temasın olduğu kalabalık ortamlarda bulaş riski artar ve salgınlar görülebilir.[30,38,55,56]

En sık olarak karşılaşılan serotipler 1-7 arasındakiler olmakla beraber, tip 1, 2, 3, 5 ve 7 özellikle solunum yolu infeksiyonlarında; tip 1, 2, 5 ve 6 ise çocukluk çağında adenoid ve tonsillerden sıklıkla izole edilen serotiplerdir. Genç erişkinlerde üst ve alt solunum yolu infeksiyonuna neden olarak en sık rastlanan tipler ise 3, 4 ve 7'dir.[30,31,56] Kışlalarda adenovirus

bulaşının ise özellikle aerosollerle gerçekleştiği ve buradaki infeksiyonlara özellikle tip 4 ve 7'nin neden olduğu bildirilmiştir.[56,57]

Göz infeksiyonları, kontamine olmuş ellerin göze değdirilmesiyle ve iyi klorlanmamış kontamine havuzlarla yüzülmesi gibi çeşitli etkenlerle gerçekleşebilmektedir. Serotip 3, 4 ve 7 yüzme havuzuyla bulaşan salgınlardan sorumlu bulunmuştur. Faringokonjonktival ateşte (PCF) etkenler özellikle tip 1-7 ve daha az sıklıkta 11-17, 19-21 ve 29 serotipleridir. Epidemik keratokonjonktivit (EKC), ileri derecede bulaşıcı ve ciddi bir hastalıktır ve serotip 8, 9 ve 37 ile ilişkili bulunmuştur.[31,58]

Serotip 40 ve 41 enterik adenoviruslardır ve özellikle yenidoğan gastroenteritiyle ilişkilidir. Fekal ve oral yolla bulaşmaktadır ve dünyanın her bölgesinde endemik gastroenterite sebep olmaktadırlar. Bu serotiplere ek olarak adenovirus A, B, C ve D türleri de akut gastroenterite yol açarlar ve en sık rastlanan serotipleri 2 ve 31'dir.[55]

İmmun yetersiz hastalarda dokuda persistan olarak bulunan adenoviruslar reaktive olabilirler. Kemik iliği transplantasyon alıcılarında HAdV insidansının %5-30 arasında olduğu bildirilmiştir. Çocuk hastalarda HAdV insidans düzeyi, yetişkin hastalara göre daha yüksektir ve mortalite ile sonuçlanabilmektedir. Kemik iliği transplant alıcılarında en sık rastlanan adenovirus serotiplerinin 34 ve 35 olduğu bildirilmiştir.[31]

2.1.6. Klinik Sendromlar

İnsanlarda hastalıkla ilişkili olan serotipler, bugüne kadar bilinen HAdV serotiplerinin üçte birini oluşturmaktadır.[31] Adenovirus infeksiyonları oldukça yaygın görülmekle beraber primer olarak infekte ettiği grup çocuklardır. Çoğunlukla infeksiyon hafif seyirlidir ve serotipe özgü bağışıklık oluşturarak kendi kendini sınırlamaktadır. Serotipler farklı doku tropizmine sahiptir ve tek bir serotip tek bir klinik hastalığa sebep olmakla beraber farklı bir klinik seyre ve hastalığa da neden olabilir.[30,31,55]

Adenovirus infeksiyonu semptomatik olarak geçirildiğinde pek çok farklı klinik yansıması görülmektedir. Genellikle üst ve alt solunum yolu infeksiyonları, gastroenterit ve göz infeksiyon tablosu görülür.

2.1.6.1. Solunum Yolu İnfeksiyonları

Üst solunum yolu infeksiyonları çoğunlukla C grubu (serotip 1, 2, 5) adenovirusların sorumlu olduğu bir klinik sendromdur. Genellikle bebeklerde ve çocukluk çağında sıklıkla karşılaşılır ve küçük çocuklarda öksürük, ateş, nezle, orta kulak iltihabı ve boğaz ağrısıyla seyreder. Grup B adenoviruslar da çocuklarda akut alt solunum yolu infeksiyonlarından sorumludur.[31,59,60]

Adenoviruslar bazen eksüdatif tonsilit tablosuna neden olabilmektedir ve belirtiler A grubu streptokok infeksiyonuna bağlı semptomlardan ayırt edilemez. Bu sendroma konjonktivit tablosunun da eklenmesiyle "faringokonjonktival ateş" kliniği gelişir ve özellikle 3 ve 7 serotipleri sorumudur.[55,60]

Özellikle HAdV tip 3, 7 ve 21'in çocukluk çağındaki pnömonilerin %10-20'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir ve hastalık %10 oranında mortalite ile seyretmektedir.[31] Ek olarak bronşit, bronşiolit ve krup tablosu da görülebilir ve hastanede tedavi gerektiren, oldukça ciddi seyirli bir infeksiyon halini alır.[55,61]

Adenoviruslar boğmaca hastalarından sıklıkla izole edilmektedir ancak immun yetersizliğe bağlı olarak persistan adenovirusun reaktive mi olduğu ya da *Bordatella pertusis* ile koinfeksiyon mu oluşturduğu netleştirilememiştir.[55]

Askeri birliklerde hastalık trakeobronşit, pnömoni ve akut solunum yolu infeksiyonları şeklinde seyreder ve serotip 4, 7 ve 21 ile ilişkilendirilmiştir.[60,62] Askeri birliklerdeki adenovirus salgınlarının epidemiyolojisi ile toplumdaki adenovirus salgınlarının epidemiyolojisi birbirinden farklıdır ve bunun nedeninin askerlerin farklı bölgelerden gelmiş olması, kapalı, kalabalık ve stresli yaşam olduğu düşünülmektedir.[63]

2.1.6.2. Göz İnfeksiyonları

Adenovirusların neden olduğu en önemli göz infeksiyonları faringokonjonktival ateş (PCF) ve epidemik keratokonjonktivittir (EKC). PCF'de eksudatif tonsilit, ateş ve halsizlik semptomlarına ek olarak, foliküler konjonktivit ve lenfadenopati görülür. Bazı olgularda kornea da etkilenir ancak hastalık 2 hafta içinde hasar bırakmadan iyileşir. Bulaş genellikle yeterince iyi klorlanmamış yüzme havuzlarından gerçekleşir ve sorumlu olan serotipler HAdV 3 ve 7'dir.[31,55]

EKC, PKC'ye göre daha ciddi ve daha bulaşıcı bir hastalık tablosu oluşturur. Bu infeksiyon; gözün toz ve moloz benzeri yabancı cisimler ile travmaya uğraması ve buna bağlı olarak korneada yüzeyel erozyon ve ardından derin infiltrasyon gerçekleşmesine bağlı olarak gelişir. Sanayi çalışanları bu infeksiyon açısından risk altındadır ve bu klinik sendrom ilk kez tersane çalışanlarında görüldüğünden hastalığa "tersaneci gözü" adı verilmiştir. En büyük EKC epidemisi 1941-1942 yılları arasında, 10.000 kişiden fazla olguyla Hawaii'de Pearl Harbour tersane çalışanları arasında görülmüştür.[30,55] EKC tablosundan sorumlu olan serotipler 8, 19 ve 37 olarak bildirilmiştir.[31]

2.1.6.3. Gastroenterit

Özellikle bebeklerde ve çocuklarda en sık karşılaşılan viral gastroenterit etkenlerden biri adenovirus olup, vakaların %5-15'inden sorumludur. Adenovirusa bağlı gastroenteritler yıl boyunca görülür, mevsimsel değişkenlik göstermezler. Gastroenteritten sorumlu en yaygın izole edilen serotipler 40 ve 41'dir. Ancak bazı durumlarda serotip 3 ve 7'nin neden olduğu solunum yolu infeksiyonlarının devamında da gastroenterit tablosuna rastlanabilir. Bulaş fekal-oral yolla gerçekleşir. Asıl semptom, dışkıda lökosit bulunmayan, kansız ve sulu diyaredir. Ancak bazı durumlarda ek olarak karın ağrısı, bulantı, kusma ve hafif ateş de görülebilir. Semptomlar yaklaşık 10 gün sürer ve ardından kendini sınırlandırır.[30,31,55]

2.1.6.4. Diğer Hastalıklar

Akut Hemorajik Sistit: Özellikle çocukluk çağında ve immun yetersiz hastalarda görülen bir klinik sendromdur. Çocuklarda en sık izole edilen serotipler 11 ve 21 olup, diğer hasta grubunda serotip 34 ve 35'tir.[31,64]

Dissemine Hastalık: Adenoviruslar immun sistemi baskılanmış hastalarda (transplant alıcıları, AIDS hastaları vb.) pek çok organı tutarak fatalite ile sonuçlanabilen, oldukça ciddi dissemine hastalığa neden olmaktadırlar. Özellikle hematopoetik kök hücre ve kemik iliği transplant alıcılarında hayatı tehdit eden infeksiyonlara neden olmaktadırlar. Virusun serotipine, yerleştiği organa ve hastanın yaşı gibi faktörlere bağlı olarak meningoensefalit, hepatit, hemorajk sistit, kolit, pnömoni ve pankreatit tabloları gelişebilir. Ancak hastalığın primer infeksiyon şeklinde mi yoksa endojen virusun reaktivasyonuyla mı geliştiği henüz bilinmemektedir.[55,65] Adenoviruse bağlı gelişen mortalite, transplant alıcılarında %6-70 arasındadır ve en sık izole edilen türler A, B ve C gruplarıdır.[55,66]

Obezite: Adenovirus tip 36'nın hayvanlarda ve insanlarda obezite ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir.[67,68]

2.1.7. Laboratuvar Tanısı

Adenovirusların laboratuvar tanısında farklı özellikteki tanı yöntemleri kombine olarak kullanılır. Adenovirusların direkt tanısında hücre kültürü, elektron mikroskopisinde görüntüleme, antijen saptama yöntemleri (enzimimmunoassay, immunokromatograf, lateks aglutinasyon) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri kullanılırken; indirkekt tanısında ise serolojik yöntemler kullanılabilmektedir. Tanı için kullanılacak olan yöntem klinik sendromun ne olduğuna, hastanın immun durumuna, hastadan alınan klinik materyale ve amaca uygun olarak (direkt olarak infeksiyon tanısı, epidemiyolojik araştırma, tarama, tiplendirme vb.) değişkenlik göstermektedir. Adenovirusun klinik tanısında infeksiyon bölgesine göre; kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), dışkı, idrar, boğaz sürüntüsü, nazofaringeal aspiratlar ve konjonktival sürüntüler gibi farklı numunelerden yararlanılabilir. Adenovirusun birden fazla bölgeden izole edilmesi ve eş zamanlı olarak kandaki adenovirus viral yükün artması dissemine adenovirus infeksiyonuna işaret etmektedir. Virus serotipine ve infekte ettiği bölgeye bağlı olarak virusun konaktan saçılma süresi değişmektedir. Adenovirusa bağlı üst solunum yolu infeksiyonu geçiren hastaların boğazından ortalama 2 gün; PKC'de boğaz, dışkı ve gözden ortalama 4 gün; keratokonjonktivitte gözden ortalama 2 haftaya kadar ve immun yetersiz hastaların boğaz ve dışkısından yaklaşık 1 seneye kadar adenovirus salınımı gerçekleşebilmektedir. Tanıda önemli kriterlerden bir diğeri de hastalığın olabildiğince erken döneminde numuneyi almak ve en hızlı şekilde laboratuvara iletmektir.[5,31,38,55,69]

Rutin tanıda adenovirusun tanımlanması için en sık kullanılan yöntemler antijen saptama, seroloji ve adenovirus DNA'sını saptamaya yönelik olarak uygulanan PCR yöntemleridir. İmmun yetersiz hastalarda saptanabilecek düzeyde antikor üretilemediğinden, bu hastalarda serolojik tanı yöntemleri tavsiye edilmemektedir. Bu nedenle serolojik yöntemler çoğunlukla epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Daha az olarak kullanılan direkt tanı yöntemlerinden biri olan elektron mikroskobunun (EM) duyarlılığı düşüktür. Hücre kültürü ise altın standart olmasına rağmen, nötralizan antikorlar nedeniyle virusun üretilememesi ve uzun sürede sonuç vermesi nedeniyle rutin tanı amaçlı kullanılmamaktadır. Tüm bu tanı yöntemleri

arasında yüksek duyarlılığı ve kısa zamanda sonuç vermesi nedeniyle gelecek vaat eden ve klinik tanıda en çok kullanılan yöntem moleküler yöntemlerdir.[38,55]

2.1.7.1. Hücre Kültürü

Adenovirusların tanımlanmasında hücre kültürü altın standarttır. Hücre kültüründe iyi bir şekilde çoğalmaları için insan epitelyal hücre serisi gereklidir. Hep-2, HeLa ve KB hücrelerinde de üreyebilirler ancak bu serilerde hücre daha hızlı dejenere olur ve adenovirusların ortalama 28 günde üreyen bazı serotipleri üreyemediği için saptanamaz. Enterik adenoviruslar da en iyi olarak HAdV-5 ile transforme edilmiş HEK hücre serisi olan Graham 293 hücre dizinde çoğalırlar. Ekilen viruslar; virusun serotipi, virusun sayısı ve ekilen hücre dizisine bağlı olarak 2-7 günlük inkübasyon periyodunun ardından CPE oluştururlar; hücreler yuvarlaklaşır ve üzüm salkımını andıran şekilde bir araya toplanır, sinsisyum oluşmaz. CPE serotipe özgü olmadığından, virusun hücre kültüründe çoğaltılmasının ardından mutlaka virusa özgü immunofloresan, hemaglutinasyon inhibisyon ve nötralizasyon gibi virusa özgü antijenlerin saptanmasıyla veya moleküler yöntemlerle virus tanımlanmalıdır.[31,38]

Adenoviruların daha pratik ve hızlı bir şekilde hücre kültüründe saptanabilmesi için "shell vial" tekniği de kullanılabilmektedir. Bu yöntemde maymun böbrek hücre dizisi veya insan embriyonik akciğer fibroblast diploid hücreleri kullanılabilmektedir. Uygulamada bu hücreler üzerine klinik numune (dışkı, kan, BOS, boğaz sürüntüsü, konjonktival sürüntüler vb.) eklenir ve santrifüj edilir. Kültürler 27 derecede 48 saat inkübasyonun ardından hekzon antijenine özgü monoklonal antikorlarla muamele edilerek adenovirus saptanır.[31,70]

2.1.7.2. Antijen Saptama

Adenovirus özgül antijenlerin saptanması için immunofloresans (IF), enzimimmunoassay (EIA, özellikle gastroenterit etkenleri olann serotip 40 ve 41'in saptanması için), immunokromatografi ve lateks aglutinasyon (LA) yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle gastroenterit ve solunum yolu infeksiyonlarının tanısında bu yöntemlerin kullanımı yaygındır. Hücre kültürüyle kıyaslandığında IF'nin duyarlılığının %40-60, özgüllüğünün %99 olduğu; EIA'nın ise duyarlılığının >%90, özgüllüğünün ise >%97 olduğu bildirilmiştir.[38,55]

2.1.7.3. Elektron Mikroskopisi

Adenovirusun morfolojik olarak görüntülenmesi istenen/gereken durumlarda kullanılan bir yöntemdir. Deneyimli personel gerektirdiğinden ve her hastanede elektron mikroskobu bulunmadığından, genel olarak rutin tanıda değil, araştırma amacıyla kullanılmaktadır.[30]

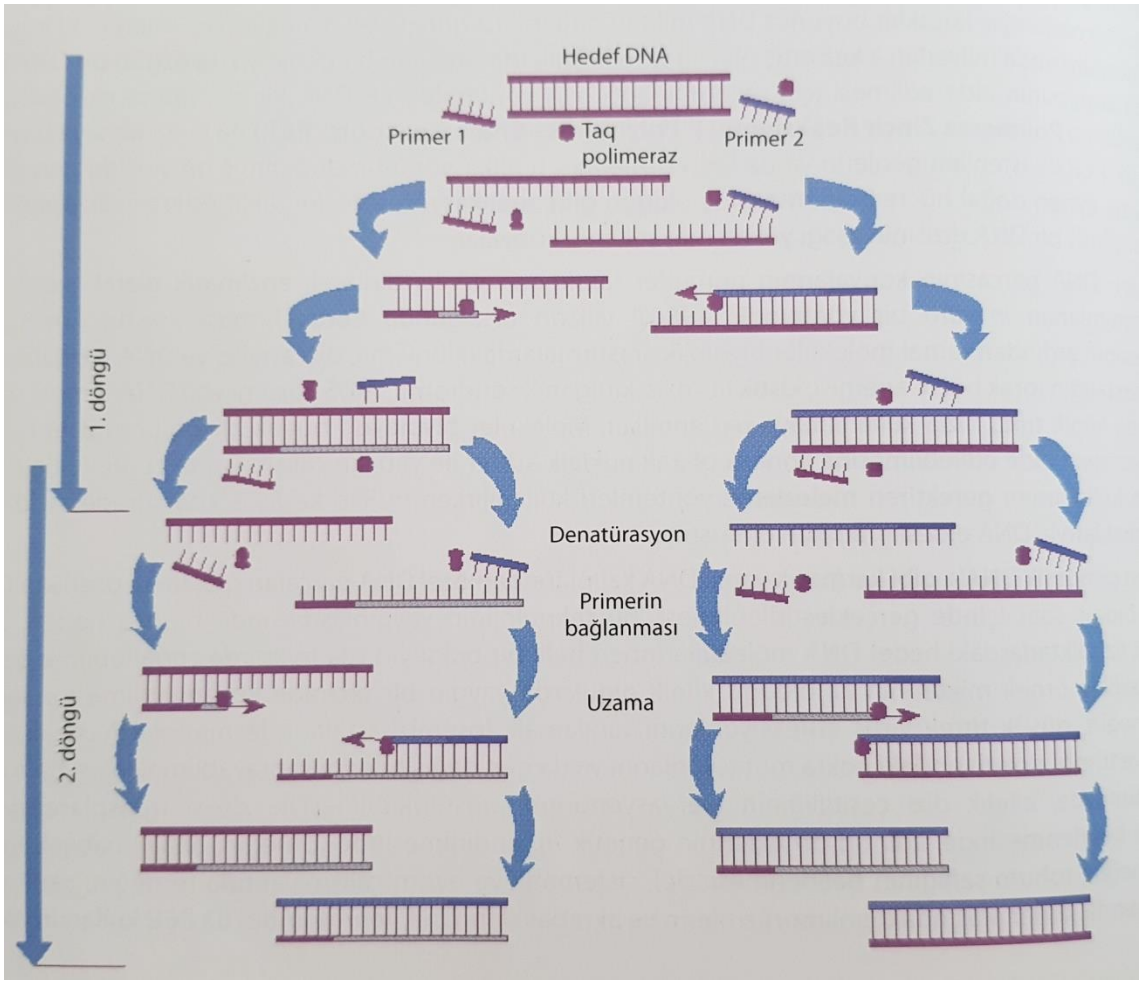
2.1.7.4. Histopatolojik İnceleme

Histolojik boyalı preparatlarda inklüzyon cisimcikleri (tek, bazofil santralde) ve "duman lekesi hücreler" ışık mikroskobu altında görülebilmektedir. Ancak bu inceleme kesin tanı için yeterli olmamaktadır. Kesin tanı için histopatolojik incelemeyi takiben in-situ hibridizasyon veya moleküler yöntemler ile adenovirusun tanımlanması gerekmektedir.[30,55]

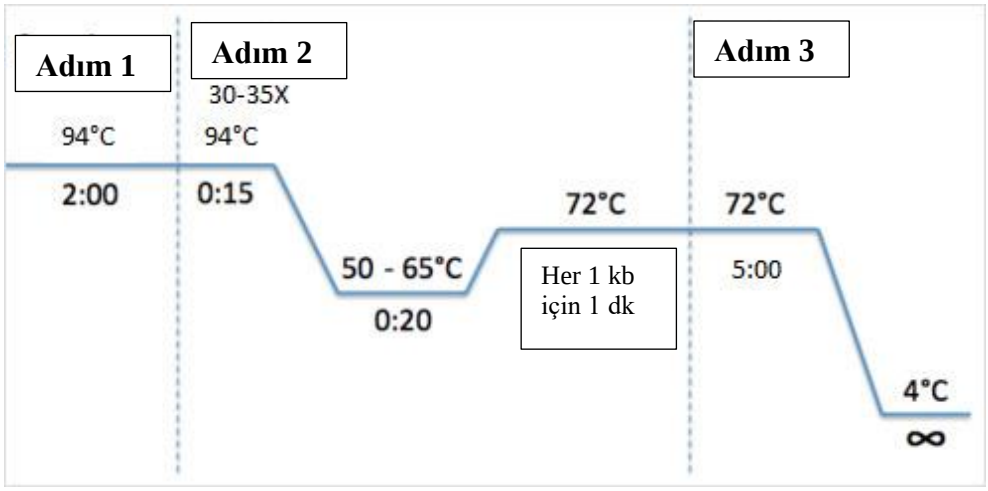
2.1.7.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Moleküler tanı yöntemleri içinde rutin tanı amacıyla kullanılan en temel uygulama, DNA'nın *in vitro* olarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemde farklı ısı döngüleri yardımıyla DNA'nın doğal hücre bölünmesinde gerçekleşen replikasyon mekanizması taklit edilmektedir ve normalden çok daha kısa süre içinde (ortalama 2 saat) hedef DNA molekülü milyonlarca kopya sentezlenebilmektedir.[71] Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında, klinik numunede çok az sayıda patojen ve patojene ait nükleik asit bulunsa bile, bu yöntem sayesinde milyonlarca kopyaya çoğaltılabilmekte ve patojen saptanarak infeksiyonun tanısı koyulabilmektedir.[72] Günümüzde viral hastalıkların rutin tanısı için PCR yöntemi kullanılmaktadır.

PCR yöntemi, çift iplikli DNA molekülünün her iki zincirinde seçilen hedef baz dizilerine birer oligonükleotid primer dizisinin bağlanması ve çoğaltılması mekanizmasına dayalıdır. PCR döngüsü 3 aşamadan oluşmaktadır: Denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama. İlk olarak hedef DNA molekülü yüksek sıcaklıkta (92-95 ^{o}C) denatüre edilir, DNA iplikleri birbirinden ayrılır. Ardından sıcaklık düşürülür (45-60 ^{o}C) ve primerlerin hedef DNA üzerindeki diziler ile eşleşmesi sağlanır. Ortamda dört çeşit deoksiribonüklozid trifosfat (dNTP), uygun pH tamponlarının (enzimin sıcaklık değişimiyle zarar görmemesi için) ve magnezyum klorürün [$MgCl_2$ (dNTP'lerle çözünebilir bir kompleks oluşturarak çift iplikli DNA'nın erime sıcaklığı (Tm) derecesini yükseltir ve polimeraz aktivitesini tetikler)] bulunmasıyla DNA polimeraz enzimi [PCR uygulamasında genellikle *Thermus aquaticus'*dan izole edilen termostabil DNA polimeraz (Taq polimeraz) kullanılmaktadır] çalışmaya başlar ve 72 ^{o}C'de primerlerin 3'-OH ucundan uzaması gerçekleşir. Ardından uygun sıcaklıkta hedef dizilerin uzama evresi gerçekleştirilir ve bu döngü ardışık olarak devam eder. Her döngüde bir önceki döngüde sentezlenmiş olan iplik kalıp görevi görür. Böylece hedef DNA molekülleri üssel olarak artar (2^{n}).[71]



Şekil 2-5: PCR döngüleri[71]



Şekil 2-6: Örnek PCR protokolü[73]

2.1.8. Tedavi

Adenovirusa bağlı gelişen infeksiyonlar için spesifik bir tedavi bulunmamakla birlikte immun yetersiz transplant alıcılarında gelişen fuminant infeksiyonlar, transplantasyondan sonra donör lenfosit infüzyon uygulamasını akıllara getirmiştir. Bununla birlikte, bir monofosfat nükleotid analoğu olan sidofovir, hücresel fosforilasyona maruz kaldıktan sonra, dCTP'nin viral DNA polimeraz yardımıyla viral DNA içine entegre olmasını inhibe emekte ve zincir uzamasına engel olmaktadır. Bu özelliği sayesinde sidofovir, adenovirus infeksiyonlarının kullanılmakta ve olumlu sonuçlar vermektedir.[74]

Kemik iliği transplant alıcılarında anti-adenoviral tedavi için öneriler aşağıdaki gibi sıralanabilir:[75]

- Lenfopenik hastada CD3+ T lenfosit sayısının <25 ad/µl ve HAdV viremisi gelişmiş ve viral yükün >1000 kopya/ml olduğu ve dışkı örneğinde HAdV miktarı kritik eşik değerin üzerinde saptandığı durumlarda eğer mümkünse immunsupresyon tedavisi azaltılmalı.

- CD3+ T lenfosit sayısının <25 ad/µl ve HAdV viremisi gelişmiş ve viral yükün >1000 kopya/ml olduğu ve dışkı örneğinde HAdV miktarı kritik eşik değerin üzerinde saptandığı durumlarda, antiviral terapide öncelikli olarak sidofovir tercih edilmeli. Tercihen haftada üç kez 1 mg/kg olarak, probenesid ve hidrasyonla birlikte tedavi edilmeli.

- HAdV tip C tanısı alan hastalarda sidofovire ek olarak ribavirin de kullanılarak kombine tedavi uygulanmalı. Bu antivirallerin kullanılamadığı durumlarda HAdV infeksiyonu gansiklovir veya foskarnet ile tedavi edilmeli.

2.2. Transplant Alıcılarında Adenovirus

Adenoviruslar immun sağlam kişilerde hafif ve kendini sınırlandıran infeksiyonlara neden olsalar da, pnömoni ve miyokardite bağlı ağır ve letal infeksiyonlara da neden olabilmektedirler.[75,76] Çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, özellikle allojenik kök hücre trasnplant alıcısı olan pediatrik hastalarda, yine bir DNA virusu olan sitomegalovirustan sonra en sık izole edilen etkenin adenovirus olduğu gösterilmiştir.[77] Ek olarak, primer infeksiyonu

takiben, özellikle çocuklarda immun baskılanma sonucunda persistan adenovirusun reaktivasyonuna bağlı infeksiyonlar gelişmektedir.[78–80] Persistan veya latent HAdV infeksiyonu ilk kez Rowe ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Yaptıkları çalışmada pediatrik hastaların büyümüş adenoidal lenfoid dokularından HAdV izole etmişlerdir.[24] Sonrasında yapılan çalışmalarda çocuklarda adenoid lenfoid dokularda büyüme olmamasına rağmen 53 adenoidal örneğin 33 tanesinde HAdV saptanmıştır. Bu sonuç adenovirusların subklinik latent infeksiyona da neden olabildiğinin bir kanıtı olmuştur. Ayrıca nazofaringeal numunelerde HAdV saptanmamış asemptomatik hastaların dışkılarında da HAdV saptanmıştır.[81],[82] Gastrointestinal sistemden HAdV izolasyonu, bağırsakla ilişkili lenfoid dokularda persistan adenovirus varlığıyla açıklanmaktadır.[83,84]

Adenoviruslar, solid organ transplantrasyon alıcıları, allojenik hematopoetik kök hücre trasnplant (allo-HSCT) alıcıları gibi immun sistemi baskılanmış hastalarda asemptomatik viremiden lokalize akut solunum yolu hastalığı, gastroenterit, konjonktivit, üriner sistem infeksiyonu ve dissemine hastalığa kadar potansiyel hayatı tehdit edici infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu hasta grubunda HAdV infeksiyonları çok ağır seyredebilmekte ve tek veya çoklu organ yetmezliğine neden olarak mortalite ile sonuçlanabilmektedir.[7,18,85] Bu duruma neden olan önemli risk faktörleri; yoğun immun baskılama amacıyla uzatılmış lenfopeni (periferal kanda <300 CD3 hücre/µl) sonucu ortaya çıkan T hücre deplesyonu, allojenik transplantasyon ve radyasyon tedavisidir. Bu şartlar viral infeksiyon veya reaktivasyon riskini artırmaktadır.[69,86,87] Özellikle pediatrik allo-HSCT alıcıları ciddi şekilde bozulmuş immun sistem fonksiyonları nedeniyle infeksiyonlara en savunmasız olan hasta gruplarından birini temsil etmektedir. Bunun nedeni, transplantasyon sonrası erken dönemde (ilk 100 gün) CD4 ve CD8 T-lenfositlerinin kısıtlı ve yetersiz fonksiyonu olarak açıklanmaktadır. Bu kapsamda özellikle pediatrik transplant alıcılarında eksojen infeksiyonlar ve rekürren infeksiyonlar yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilmektedir.[5]

Allo-HSCT alıcılarında HAdV infeksiyonu işe ilişkili verileri anlayabilmek için, öncelikle HAdV tanısı ve yönetimi ile ilgili güncel yaklaşımı anlamak gerekir. Allo-HSCT alıcılarında HAdV infeksiyonuyla ilişkili risk göz önünde bulundurularak, direkt HAdV tanı ve tedavi kılavuzu geliştirilmiştir.[69,88,89] Buna göre pediatrik ve yetişkin alıcılarda transplantasyonu takiben haftada bir kez kan ve dışkı örneklerinden birer numune alınması ve PCR ile HAdV takibi yapılması önerilmektedir. HAdV viral yükünün ≥1000 kopya/ml olması durumunda önleyici tedaviye başlanması önerilmektedir.[18]

HAdV'nin neden olduğu dissemine infeksiyon insidansı pediatrik alıcılarda (%6-%42) yetişkin alıcılara (%3-%15) göre birkaç kat daha yüksektir.[7] Bunun sebebi virusun özellikle çocukluk çağında kazanılarak persiste olması ve çocuklar arasında sürekli sirkülasyonu olarak açıklanmaktadır.[75] Pediatrik hastalarda gastrointestinal dokuda HAdV'nin yoğun proliferasyonu sonucu dışkıda saptanan viral yük artışı [90] ile ilişkili diyare ile karakterize bağırsak tutulumu en sık karşılaşılan klinik tablodur. Bu veriler transplantasyon alıcılarında HAdV reaktivasyonunun bağırsak ilişkili lenfoid dokulardan geliştiği fikrini desteklemektedir.[90,91] Yapılan çalışmalarda HAdV'nin, immun sistemi baskılanmış pediatrik transplant alıcılarında persiste olduğu bölgenin çoğunlukla gastrointestinal sistemin terminal ileum bölgesi olduğu gösterilmiştir.[6] In-situ hibridizasyon ve immunokimyasal testlerde, HAdV'nin ana persistans bölgesinin lamina proprianın lenfoid hücreleri olduğu gösterilirken, transplant alıcılarında virusun replikasyon bölgesinin intestinal epitel hücreleri olduğu gösterilmiştir. Bu veriler, intestinal lenfoid hücrelerinin HAdV'nin persiste olması ve reaktivasyonu için rezervuar bölge görevi görürken, virusun viral replikasyonu ve yayılımı için ana bölgenin intestinal epitelyum olduğunu göstermektedir.[6]

İmmun sağlam çocukların yaklaşık %37'sinde, gastrointestinal sistemde persistant HAdV varlığı bildirilmiştir. Bu oran, immun baskılanmış çocuklarda da benzer olmakla beraber, latensi görülen çocukların immun yetersiz olduğu durumlarda virus rekürrensine bağlı dissemine hastalık gelişimi açısından risk altında oldukları düşündürmektedir.[6,75,92] Sonrasında yapılan çalışmalarda, transplantasyondan önce gastrointestinal sistemde persistant HAdV varlığının, transplantasyon sonrasında invazif infeksiyon gelişimiyle korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada allo-HSCT alıcısı olan 300'den fazla çocuk, transplansayon öncesinde ve sonrasındaki takip eden 100 gün boyunca düzenli aralıklarla takip edilmiştir. Bu amaçla haftalık olarak, gastrointestinal sistemdeki HAdV reaktivasyonunu takip edebilmek için dışkı numunesi ve dissemine hastalık gelişimini takip etmek için ise kan örnekleri alınmıştır. Örnekler kantitatif real-time-PCR (qPCR) yöntemi ile çalışılmıştır ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Verilere göre pediatrik alıcıların %14'ünde allo-HSCT transplantasyonu öncesinde de dışkıda HAdV saptanmıştır ve bu hastaların gastrointestinal sisteminde transplantasyon sorası ilk 3 hafta içinde hızlı bir şekilde viral replikasyonun gerçekleştiği ve viral yükün arttığı, buna bağlı olarak transplantasyon öncesinde HAdV saptanmayan pediatrik alıcılara oranla, bu gurupta çok daha yüksek oranda invazif infeksiyon

geliştiği bildirilmiştir.[93] Bu durum, tüm pediatrik alıcıların HAdV infeksiyonu açısından rutin olarak takibinin önemli olduğunu göstermektedir.[18,94–96]

2.2.1. Transplant Alıcılarında Adenovirusların Tanımlanması ve İzlemi

Yapılan çalışmalar, erken evrede HAdV tanısının koyulması ve transplantasyon öncesinde intestinal sistemden virus saçılımının taranarak, zamanında önleyici terapötik terapinin önemini vurgulamaktadır. Bu yeni oluşumlar pediatrik transplant alıcılarının klinik yönetimi ve hayatı tehdit eden invazif HAdV infeksiyonlarının değerlendirilmesi için ışık tutmuşlardır.[18,75,77]

HAdV infeksiyonu açısından yüksek risk altındaki hastalarda önleyici tedaviye dair adenovirus tarama ve izlemi için güncel öneriler hala nispeten çeşitlidir ve standartlaştırılmış yaklaşımların oluşturulmasına izin veren güvenilir veriler sağlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Antiviral tedavide başarılı olabilmenin en önemli koşullarından bir tanesi, optimize edilmiş tanı yöntemleriyle en hızlı şekilde tanı koyulması ve zamanında antiviral tedaviye başlanmasıdır. Yapılan son çalışmalar, pediatrik allo-HSCT alıcılarında HAdV izleminin, art arda alınan dışkı örnekleriyle takip edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Transplantasyondan sonraki ilk 100 gün, immun sistem sağlıklı olarak çalışmamaktadır ve transplant alıcısı rekürren ve invazif infeksiyonlar açısından ciddi bir risk altındadır. Transplantasyonun ardından bu riski azaltmak ve pediatrik alıcılarda mortaliteye kadar sebebiyet verecek dissemine hastalığın önüne geçebilmek için, bu 100 günlük periyot içinde pediatrik alıcıların dışkı örneklerinin haftalık olarak HAdV açısından izlemi önerilmektedir.[75] Pediatrik hastalarda transplantasyondan sonra ortalama olarak on birinci günde dışkıda HAdV eşik değeri kritik değerin üstüne çıktığı ve vireminin başladığı tespit edilmiştir.[92,93] Bu nedenle, belirtilen aralıklarla seri dışkı örnekleri taranan hastaların periferik kanında HAdV'nin gözetimi, dışkıdaki kritik eşik düzeyine ulaşıldığında başlatılabilir.[7]

Yapılan çalışmalarda allo-HSCT alıcılarının dışkı örneklerinde, serum örneklerine kıyasla çok daha yüksek oranda HAdV saptanmıştır. En çok izole edilen serotiplerin HAdV-C, D ve F grubuna ait serotipler olduğu bildirilmiştir.[97] Bu bulgular, transplant alıcılarının transplantasyon sonrası süreçte gastrointestinal sistemde persistan HAdV viral yükünün dışkı örnekleriyle düzenli olarak takip edilerek erken tanı ve tedavi gerekliliğinin önemini göstermektedir.[90] Ancak dışkıda HAdV saptanması ve viremi gelişimi arasındaki kanıtlanmış korelasyon, pediatrik allo-HSCT alıcılarında ECIL (European Conference on Infections in

Leukemia) önerileri doğrultusunda yeni bir takip sistemi fikrini oluşturmuştur. Buna göre; dışkı örneğinin seri olarak alınamadığı hastalarda immun sistem yeniden yapılanana kadar, en az haftada bir olmak şartıyla periferal kanda HAdV taraması yapılmalıdır.[69] Bu sayede transplantasyon sonrası HAdV'ye bağlı dissemine hastalık gelişiminin de önüne geçilmesi hedeflenmektedir ve tedavinin kontrollü bir şekilde devam etmesi sağlanır.

Hassas kantitatif PCR teknikleriyle adenovirusun izlemi, viral rekürrensin erken evrede tanımlanması ve adenovirusa bağlı morbidite ve mortaliteyi engellemek adına en önemli dayanak noktası olan antiviral terapi gibi öncelikli müdahalelere en erken şekilde başlanmasını sağlamaktadır.[19] Hassas PCR yöntemleri ile, T lenfositlerinin yapılanmaya başladığı dönemde ve özellikle viral yükün düşük olduğu (kanda <1000 HAdV kopya/ml) durumlarda da adenoviremi saptanabilmektedir. İmmun sistemin sağlıklı çalıştığı durumlarda adenoviremi asemptomatiktir ve kendiliğinden iyileşebilir. Ancak bunun aksine lenfopenik bireylerde (mikrolitrede lenfosit sayısı <300, CD3 T lenfosit sayısı <25) viral kopya sayısı kanda 1000 kopya/ml'nin üzerine çıkabilmektedir. Bu durum, dissemine adenoviral hastalığın gelişimine sebep olarak mortalite oranını %70'e kadar artırabilmektedir.[66,98–100]

Öneriler[75];

- Pediatrik ve yetişkin transplant alıcılarında, transplantasyon sonrasında 1-2 hafta içinde en az 2 farklı günde dışkı örneği alarak yüksek duyarlılıkta kantitatif PCR tekniği ile HAdV saçılımının takibi,

- Pediatrik ve yetişkin transplant alıcılarında CD3+ T hücre sayısı >300 adet/µl olana kadar, hassas kantitatif PCR tekniği ile her hafta dışkıda HAdV saçılımı ve viral yük takibi,

- Pediatrik ve yetişkin transplant alıcılarında CD3+ T hücre sayısı >300 adet/µl olana kadar veya immunsupresif tedavi kesilene kadar en az haftada bir kez periferal kan örneğinde hassas kantitatif PCR tekniği ile HAdV izlemi,

- Periferal kan örneğinde HAdV pozitifliği saptanan, viral yükün <1000 kopya/ml olduğu ve sistemik semptom gelişmemiş durumlarda haftada iki kez hassas kantitatif PCR tekniği ile HAdV düzeyinin takip edilmesi,

- HAdV'ye özgü T lenfotsitlerinin varlığında veya dışkıda kritik eşik değerini geçen yüksek düzey HAdV viremi saptanan hastaların HAdV'ye bağlı hastalık gelişimi açısından yüksek riskli hasta grubunda değerlendirilmesi,

- Antiviral tedavi altında HAdV viremisi geliştiren hastalarda, tedaviye yanıt ve surveyans izlemi açısından haftada 1 veya 2 kez viral yük seviyesinin hassas kantitatif PCR tekniği ile takip edilmesi,

- Öncelikli anti-HAdV tedavisi altındaki pediatrik KİT alıcılarında dışkıda viral yükün kritik eşik değerden fazla olması ancak viremi gelişmemiş olması durumunda, tedaviye yanıtın takip edilmesi amacı ile haftada 1 veya 2 kez dışkı örneği alınarak HAdV düzeyinin hassas kantitatif PCR tekniği ile takip edilmesi.

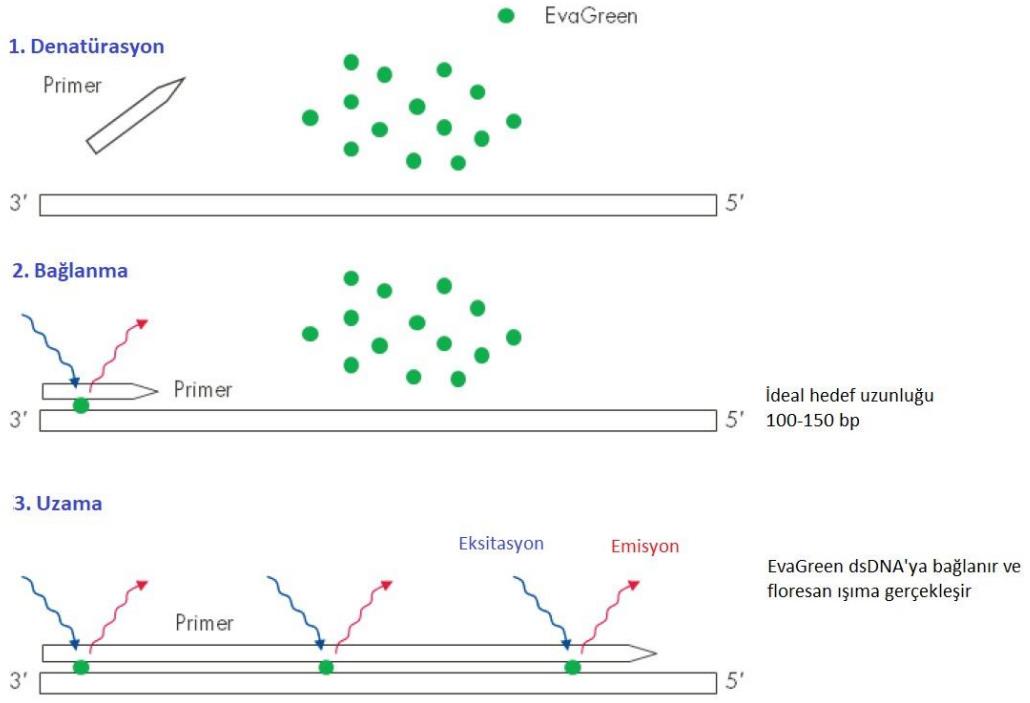
2.3. Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR teknolojisi ilk kez 1985 yılında Mullis ve arkadaşları tarafından tanıtılmıştır.[101] Bundan sadece bir kaç sene sonra, 1988 yılının başında henüz qPCR sistemi geliştirilmeden önce, Saiki ve arkadaşları tarafından dPCR konsepti tanımlanmış ve 1990 yılında HIV DNA'nın saptanmasına yönelik ilk makale yayınlanmıştır.[102,103] 90'lı yılların başında dPCR ile çeşitli makaleler yayınlanmış olsa da, qPCR tekniğinin tanımlanması ve hızla gelişmesiyle birlikte dPCR tekniği arka planda kalmıştır.[104]

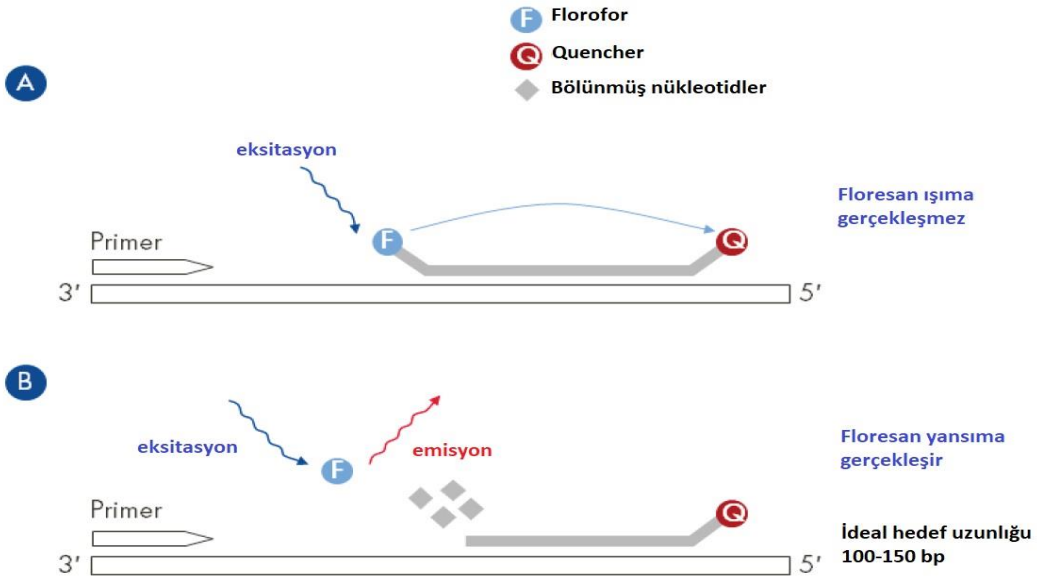
Polimeraz zincir reaksiyonu keşfedildiğinden beri hastalıkların moleküler tanısında, patojenlerin ve onkojenlerin tanımlanmasında önemli bir rol sahip olmuştur. Geçtiğimiz 30 yıl içinde PCR teknikleri gelişmiş ve daha duyarlı ve çoklu tanımlamaya elverişli hale getirilmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki nükleik asidi çoğaltmak ve saptamak amacı ile 1980'li yılların başlarında ilk olarak kalitatif ve relatif olarak sonuç veren end-point PCR (birinci nesil PCR) geliştirilmiştir.[105],[106] Ardından ikinci jenerasyon PCR tekniği olan real-time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemle konvansiyonel PCR'ın aksine, hedef nükleik asidin floresan boyalar yardımıyla işaretlenerek, eş zamanlı olarak monitörize edilmesi sağlanmıştır. Bu yöntem kantitaif sonuç vermesine rağmen, kantitasyonda floresan kaynaklı hataların oluşması ve polimerazın real-time PCR'da amplifikasyon verimliliği konusundaki tercihi nedeniyle, hedef nükleik asit sayısı kesin bir şekilde saptanamamaktadır. Bunlara ek olarak real-time PCR yöntemi deneyimli personel gerektirmekte, standart referanslarla optimizasyon ve validasyon

gerektirmektedir. Bu da sonuçların laboratuvarlar arasında farklılık göstermesine neden olmaktadır.[107,108]

PCR teknolojisinde en güncel tekniklerden birisi ise farklı patojenlerin eş zamanlı mutlak kantitasyonuna olanak sağlayan dijital PCR yöntemidir.[21] Dijital PCR sistemleri, hedef DNA'nın yüksek duyarlılıkta kantitatif olarak saptanmasına yönelik olarak geliştirilmiştir. Dijital PCR, end-point PCR prosedürünü kullanır ancak uygulama sırasında PCR reaksiyonlarını binlerce sayıda nano boyutunda küçük rastgele partisyonlara ayırır. Böylelikle tek bir hedef DNA'nın yakalanarak, her bir DNA'nın PCR reaksiyonuna katılımının sağlanması ve duyarlılığın yükseltilmesi hedeflenmektedir. Bu sistemde hedef DNA spesifik problar (Şekil 2-7) veya floresan boyalar (EvaGreen, SYBR Green vb. [Şekil 2-8]) yardımıyla işaretlenmektedir. Reaksiyon sonrasında hedef DNA yönünden pozitif olan partisyonların ışıma düzeyleri ölçülmekte ve mutlak kantitasyon sağlanabilmektedir.[109]



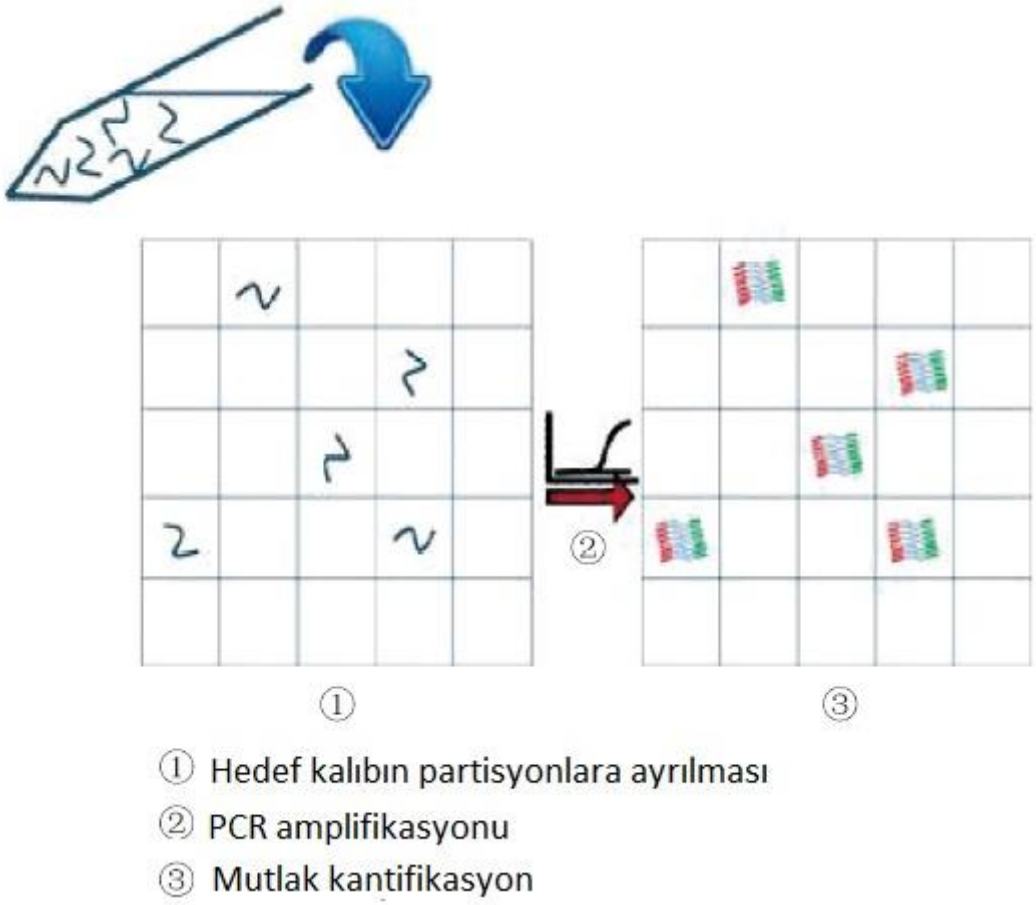
Şekil 2-7: EvaGreen çalışma prensibi. PCR reaksiyonu boyunca Taq polimeraz tarafından primer uzaması gerçekleşir. EvaGreen, oluşan çift zincirli DNA molekülüne bağlanır ve floresan ışıma gerçekleşir.[109]



Şekil 2-8: Hidroliz probu çalışma prensibi. PCR döngüsü boyunca hem primerler hem de problar hedef diziye bağlanır ve uzama gerçekleşir. Floroforun söndürücü (quencher) ile yakınlığı, floroforun floresan yaymasını önler. Uzama aşamasında, Taq DNA polimeraz enzimi primerin uzamasını sağlar. Taq polimeraz enzimi TaqMan probuna ulaştığında, 5′→3′ ekzonükleaz aktivitesi, floroforu probdan ayırır ve serbest florofordan gelen floresan sinyali ölçülür. Bu sinyal, birikmiş PCR ürününün miktarı ile orantılıdır.[109]

2.3.1. Dijital PCR Çalışma Prensibi

Dijital PCR yönteminde DNA kalıpları amplifikasyonun ilk aşamasında her bir reaksiyon partisyonunda 0-3 adet DNA kalıbı olacak şekilde bilinen konsantrasyonlara rastgele olarak bölünür (şekil 2-9). Reaksiyonların bu şekilde ayrı partisyonlarda gerçekleşmesi, hedef DNA yükünün düşük olduğu durumlarda bile saptanabilmesini sağlar, bu da testin duyarlılığını artırır. Günümüzde kullanılan dijital PCR prosedürlerinde hedef DNA'ların nano hacimlerde partisyonlara ayrılması nano-kuyucukların kullanılmasıyla veya hedef DNA'nın nano hacimli yağ damlacıkları içine hapsedilmesi (damlacık tabanlı dijital PCR, ddPCR) yöntemleriyle sağlanmaktadır. Her iki şekilde de dijital PCR yöntemi yüksek duyarlılıkta sonuç veren bir yöntem haline gelmiştir.[110]

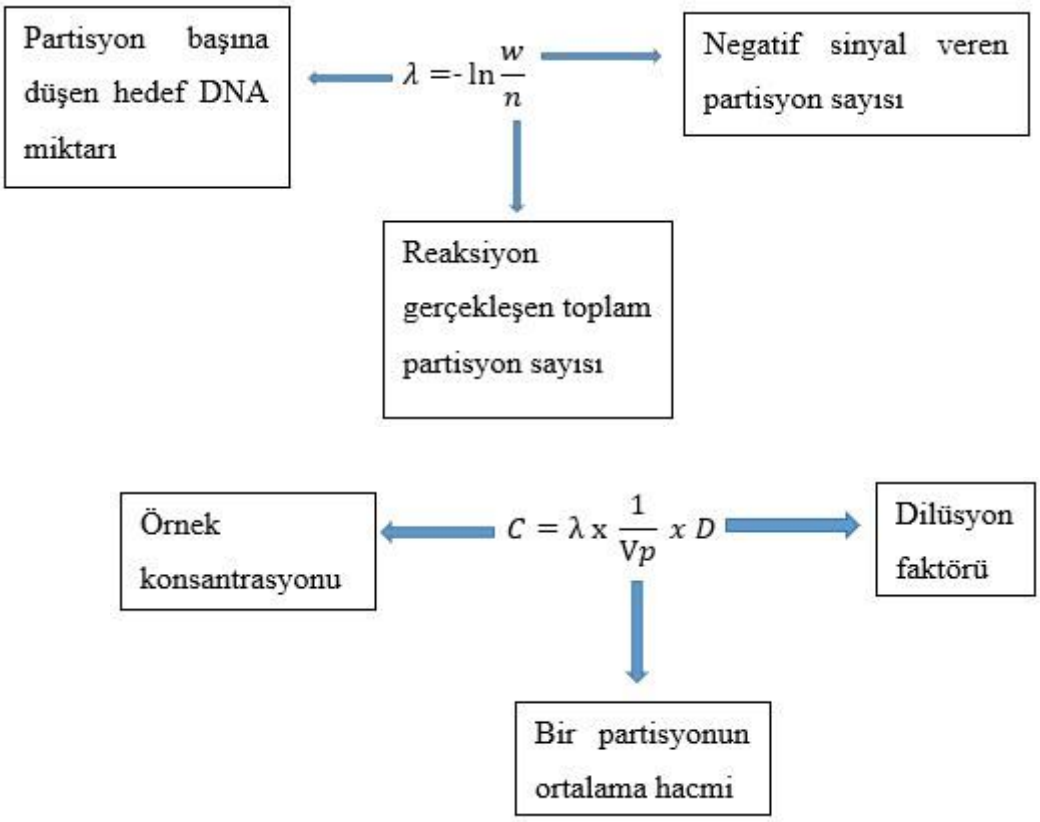


Şekil 2-9: Dijital PCR analiz prensibi [110]

Dijital PCR sisteminde DNA kalıpları randomize sayılarda partisyonlara ayrıldığından, hedef DNA sayısını kantitatif olarak hesaplayabilmek için Poisson istatistiği kullanılmaktadır. Bunun için bir kuyucuktaki her bir nano partisyon içeriğinde bulanan ortalama hedef DNA sayısı, var olan toplam partisyon sayısıyla çarpılarak hesaplama yapılır. Buna göre pozitif sinyalin "1", negatif sinyalin "0" kabul edildiği binominal bir dağılımla partisyon başına düşen hedef DNA miktarı (λ), negatif sinyal veren partisyonların sayılarak ve reaksiyon karışımı ile doldurulmuş tüm partisyonların hacmi hesaba katılarak belirlenir. Lambda hesaplandıktan sonra, her bir partisyon hacmi içinde DNA içeren örnek konsantrasyonu (*C*) hesaplanır.[104] Hesaplamada ilk olarak negatif sinyal sayısından yararlanılmasının sebebi, pozitif sinyal veren partisyonlarda randomize olarak her bir partisyonda 1-3 adet DNA kalıbı bulunabilmesi nedeniyle net sayının kesin olarak hesaplanamamasından kaynaklıdır. Poisson analizinde binominal dağılım neticesinde bazı durumlarda Possion hatası denilen bir durum oluşmaktadır.

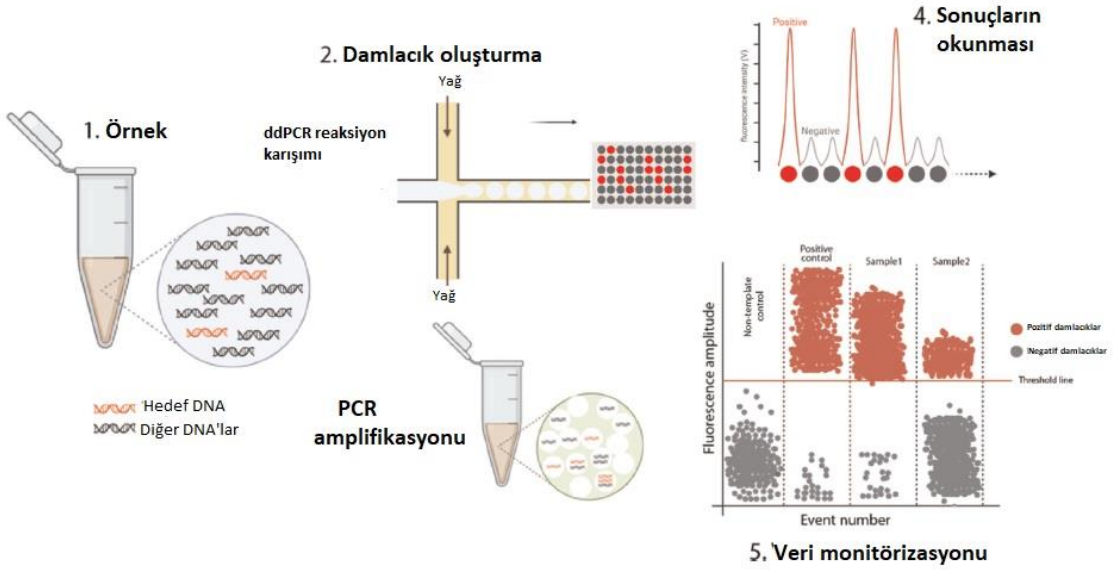
Bu durum hedef nükleik asidin azami partisyon sayısına bölünemeyecek kadar fazla olduğu durumlarda yüksek ışımaya bağlı kantitatif veri elde edilememesiyle ya da çok düşük nükleik asit konsantrasyonlarında negatif partisyonlara çok yakın sinyaller ile sıfıra yakın kopya sayıları (0-1 kopya/µl) elde edilmesinden doğan güvensiz veri analiziyle sonuçlanmaktadır.[104,111–113] Hedef DNA kalıbının uzun olduğu durumlarda (>150 bp), fragmentler doğru bir şekilde partisyonlara ayrılamadığından (hem nanoplate hem de damlacık tabanlı dijital PCR için geçerli), fragmentleri kısaltmak amacı ile restriksiyon enzimlerinden yararlanılmaktadır. Bu sayede testin verimliliği artırılmaktadır.[114,115]

Dijital PCR yönteminde mutlak nicel sonuç elde edildiğinden, hedef DNA miktarını belirlemek için standart eğri oluşturma ihtiyacı bulunmamaktadır.[109] Dijital PCR sisteminin bir diğer avantajı ise, negatif partisyon sayısına göre sistemin otomatik olarak eşik değer belirleyebilmesi ve bunun sonucunda qPCR'a göre daha güvenilir sonuç verebilmesidir. Standart eğriye gerek duyulmaması ve otomatik eşik değer belirleme özellikleri sayesinde, dijital PCR sistemi farklı koşullardan (farklı personellerin çalışması, manuel eşik değeri belirlemeden doğacak olan laboratuvarlar arası farklı sonuçlar vb.) etkilenmemekte ve qPCR'a kıyasla daha stabil sonuçlar vermektedir.[104,116]



2.3.2. Damlacık Tabanlı Dijital PCR Sistemi

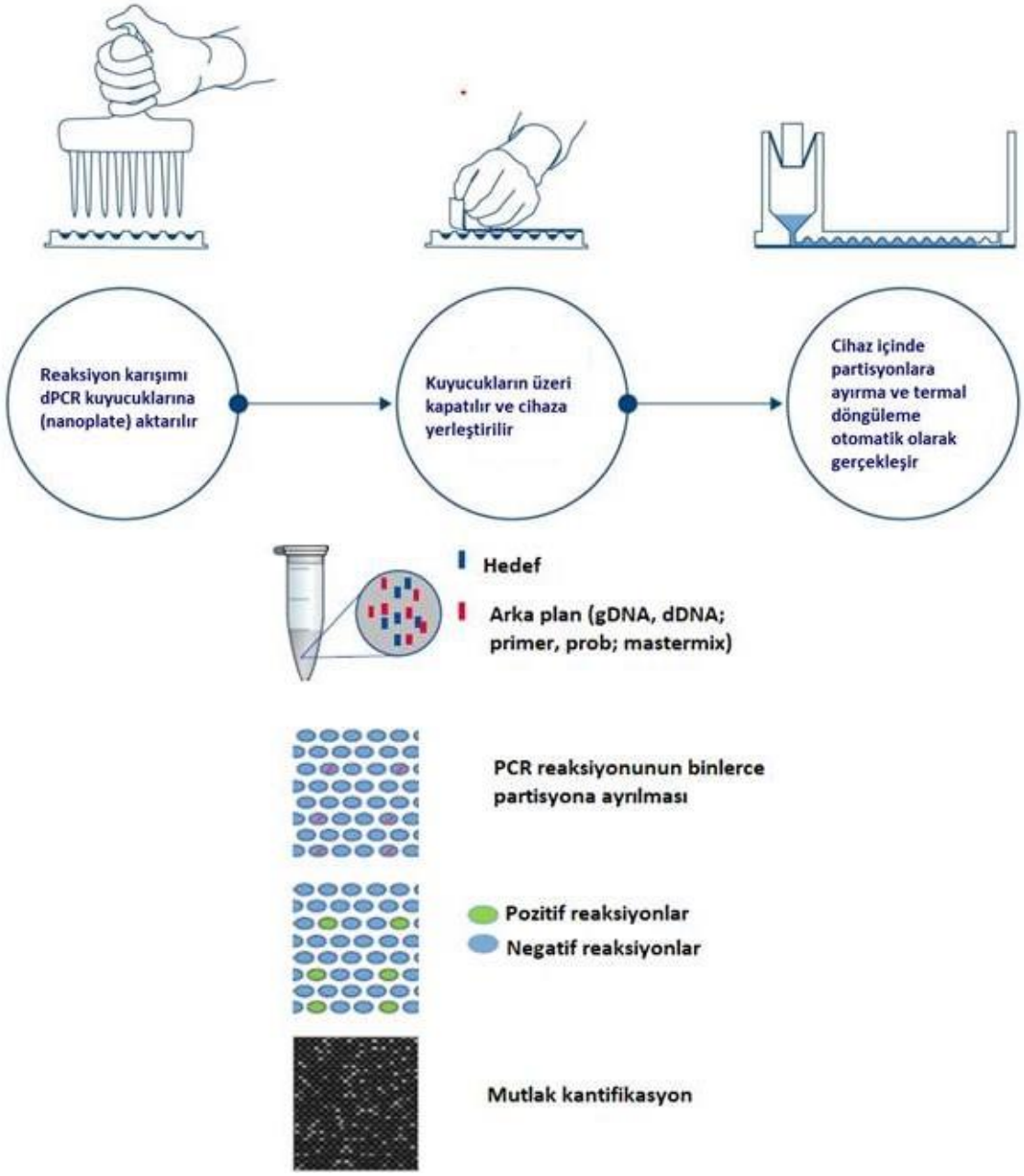
Damlacık tabanlı PCR'ın (ddPCR) çalışma prensibi; büyük hacimli bir PCR reaksiyon karışımını, nanolitreden pikolitreye kadar küçük damlacıklara ayırarak, bu damlacıkların içine çift iplikli DNA'nın hapsedilmesi ve burada PCR amplifikasyonunun gerçekleştirilmesine dayanmaktadır. Amplifiye olmuş damlacıkların floresan boyalar veya spesifik problar sayesinde ışıma oluşturması ile hedef genin kopya sayısı hesaplanır.[110,117,118] Bu sistemde yağ ve suyun özgül ağırlık farkından dolayı yağın sudaki çözünmezlik özelliğinden faydalanarak, su içinde damlacıklar oluşturulur. Hedef DNA kalıbı ve kalıba özgü spesifik primer ve problar da bu damlacıkların içine hapsedilir (şekil). [110]



Şekil 2-10: ddPCR'ın şematik ilüstrasyonu [114]

2.3.3. Mikroakışkan/Nanoplate Tabanlı Dijital PCR

Bu teknolojide çok sayıda mikro kanal ve mikro kuyucuk içeren plate kullanılmaktadır. Kuyucuklara standart hacimde yüklenen PCR reaksiyon karışımı, mikro kanallar aracılığıyla mikro kuyucuklara dağıtılır bu sayede hedef DNA 0-3 adet arası olacak şekilde bu kuyucuklara dağılır. Amplifikasyon bu kuyucuklar içinde gerçekleşir. Karışımın partisyonlara ayrılması işlemi mikro pompalar ve mikro valfler aracılığıyla kontrol edilmektedir (şekil).[114]



Şekil 2-11: Nanoplate tabanlı dPCR sistemi şematik ilüstrasyonu[119]

Dijital PCR yönteminin avantajları;

1. Her bir partisyon içindeki hedef DNA sayısı herhangi bir standart eğri hesaplamasına gerek kalmadan tayin edilebilir. Böylelikle hedef DNA'nın saptanması, viral yük tayini ve mikrobiyal kantitasyonda uygun bir yöntem olmaktadır.

2. Hedef DNA'nın nano kuyucuklara bölüştürülmesi sayesinde testin duyarlılığı yükselir.

3. Hedef DNA sayısı düşük olan çalışmalarda, sistem arka planında oluşacak olan gürültü sinyallerini baskılar, partisyonlar içerisindeki hedef sinyali zenginleştirerek daha efektif sinyal alınması ve hassas bir biçimde hedef yükün ölçülmesi sağlanır.

4. qPCR'a oranla hata oranı daha düşüktür ve küçük farklılıkların kantitasyonuna imkân verir.

Yöntemin yüksek duyarlılığı, kesinliği ve tekrarlanabilirliği, patojenlerin kesin kantitatif tanısındaki başarısı, çok düşük konsantrasyonlarda bile hedefin yüksek duyarlılıkta saptanabilmesi, kapalı bir sistem olması neden ile kontaminasyon riskinin düşük olması ve sistemin kolay çalışılabilir olması da dijital PCR'ın avantajları arasında sayılabilir.[21] Tüm bunlara ek olarak dijital PCR yöntemleri diğer PCR yöntemleri ile kıyaslandığında düşük kopya sayılarını (1 kopya/µl'ye kadar) daha hassas olarak saptayabildiğinden, "pencere dönemi" olarak adlandırılan süre (hastalığın bulaşı/başlangıcı ile etkenin tanı yöntemleri ile saptanabilir düzeylere çıktığı zaman aralığı) dijital PCR yöntemlerinde daha kısa olmaktadır.[114]

2.4. Bir Laboratuvarda Yeni Geliştirilen Kalitatif ve Kantitatif Testlerin Tanı Kriterleri

Günümüzde virusların tanısında kullanılan en önemi teknik nükleik asit testleridir. Nükleik asit testleri hemen her laboratuvarda rutin tanıda kullanılmaktadır. Nükleik asit testleri tam otomatize kapalı sistemlerden, gerçek zamanlı amplifikasyon teknolojilerine ve hatta dijital amplifikasyon teknolojilerine doğru gelişim göstermekte ve ilgi odağı haline gelmektedir. [120] Nükleik asit testlerinin klinik tanıda önemli olmalarının sebepleri arasında; yüksek özgüllükte ve yüksek duyarlılıkta sonuç vermeleri, mutlak kantitasyona elverişli olmaları ve pencere döneminin daha kısa olması faktörleri sayılabilir.

Nükleik asit testlerinin gelişmesiyle Tıbbi Laboratuvarların Akreditasyonu (ISO 15189 ve ISO 17025) gereğince kılavuzlar ve validasyon-verifikasyon protokolleri yayınlanmıştır. Bu kılavuzlara göre FDA onaylı kitler ve laboratuvarda geliştirilen kalitatif ve kantitatif testler için belirli tanı kriterleri mevcuttur.[120–122]

Kalitatif ve kantitatif testler için temel performans özellikleri şunlardır:

Tekrarlanabilirlik; aynı laboratuvarda, aynı ekipmanla, aynı analist tarafından, aynı numuneler üzerinde ve aynı yöntemler ile elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasına dayanmaktadır.[123,124]

Tekrar üretilebilirlik; farklı kondisyonlarda, farklı laboratuvarlarda farklı analistler arafından birkaç kez test edilmesiyle ortaya çıkan sonuçların tutarlılığının değerlendirilmesiyle ölçülür.[120,125]

Hassasiyet-prezisyon; tekrar eden testlerin kendi içinde ve birbiri arasındaki tutarlılıkla ölçülür ve genellikle varyasyon katsayısıyla (%CV) ifade edilir.[120,124] Hassasiyet %CV = (standart sapma / ortalama değer) x 100 denklemiyle hesaplanır.

Doğruluk; geniş bir test sonuçları serisinden elde edilen değer ile kabul edilen bir referans değer arasındaki uyumdur.[122,124]

Analitik duyarlılık (LoD); genellikle bir amplifikasyon ürününün en az 0,95 (% LoD95) olasılıkla saptandığı hedef DNA konsantrasyonudur. Geliştirilen bir yöntemin analitik duyarlılığını belirlemek amacıyla, yöntemin yalnızca tek bir matriste farklı hedef konsantrasyonlarda bir hedef DNA seyreltme serisi ile test edilmesi gerekir.[122]

Kantitasyon sınırı (LoQ); bir numunede güvenilir bir şekilde ölçülebilen (kantite edilebilen) en düşük analit miktarıdır.[122]

3. YÖNTEM

Bu tez çalışması Eylül 2021-Eylül 2022 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (IUC-BAP) tarafından 16 Aralık 2020 tarihli ve 34787 numaralı tez projesi kapsamında desteklenmiştir.

Bu çalışma in-vitro metodolojik bir çalışmadır. Çalışmada kullanılan primer ve prob dizileri literatür taramaları sonucunda seçildi. Çalışmada kullanılan adenovirus DNA hekzon bölgesi, fakültemiz moleküler mikrobiyoloji rutin tanı laboratuvarında kullanılan QIAstat-Dx (Qiagen, Almanya) multipleks real-time PCR cihazında adenovirus pozitif saptanan örneklerin ekstraksyionlarından adenovirus DNA'sına ait hekzon bölgesinin PCR ile klonlarak prüfiye edilmesiyle elde edildi. Klonlanan hekzon bölgesinden bir havuz oluşturuldu ve bu havuz ana stok olarak muhafaza edildi. Hazırlanan stoktaki DNA konsantrasyonu Qubit florometre ile nanogram/µl cinsinden ölçüldü. Ardından, adenovirusun dijital PCR ile tanısına yönelik geliştirilmesi planlanan testin dinamik aralığını, saptama sınırını (limit of detection, LoD), ölçüm limitini (limit of quantification, LoQ), tekrarlanabilirliğini ve gerçekliğini saptayabilmek amacıyla, izole edilen HAdV DNA'sının onar kat sulandırımlı ardışık 4 adet dilüsyonu birbirinden bağımsız üç oturumda üçer tekrarlı olarak çalışıldı. Ek olarak, hazırlanan bu dilüsyonlar aynı primer ve problar kullanılarak güncel olarak adenovirus tanısında kullanılmakta olan real-time PCR yöntemi ile de üç tekrarlı olarak çalışıldı ve dijital PCR ile real-time PCR testlerinin performansları karşılaştırıldı. Deneylerde dijital PCR çalışmaları için QIAcuity dijital PCR sistemi (Qiagen, Almanya); real-time PCR çalışmaları için ise Rotor Gene-Q sistemi (Qiagen, Almanya) kullanıldı.

3.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Malzemeler, Kitler ve Sarflar

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Real-time PCR cihazı (Rotor Gene-Q, Qiagen, Almanya)

- Dijital PCR sistemi (QIAcuity, Qiagen, Almanya)
- Qubit 3 Fluorometer (Thermo Scientific, ABD)
- Vorteks Combispin (Biosan, Litvanya)
- Manyetik stant (Hain Lifescience GmbH, Vers.3, Almanya)

3.1.2. Primer, Prob ve Kimyasal Malzemeler

- Primerler (Sentromer DNA Teknolojileri, Türkiye)
- Floresan işaretli prob (Sentromer DNA Teknolojileri, Türkiye)
- 4x dPCR prob PCR master mix (Qiagen, Almanya)
- %80 etanol

3.1.3. Kitler

- QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen, Almanya)
- Accu Green High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium, ABD)

3.1.4. Sarf Malzemeler

- QIAcuity Nanoplate 26k 24 kuyucuklu (Qiagen, Almanya)
- Manyetik boncuklar (Kapa Pure Beads, Roche, Güney Afrika)
- Pipet uçları
- DNaz/RNaz içermeyen su Multicell (Wisent, Inc., Kanada)
- 1,5 ml’lik santrifüj tüpleri (UltraFlux, SSIBio, A.B.D.)

3.2. Yöntem

İnsan Adenovirus DNA'sının mutlak kantitasyonu için dijital PCR yöntemine dayalı test formatının geliştirilmesine yönelik iş akış şeması sırası ile aşağıda belirtildiği şekilde planlanmıştır:

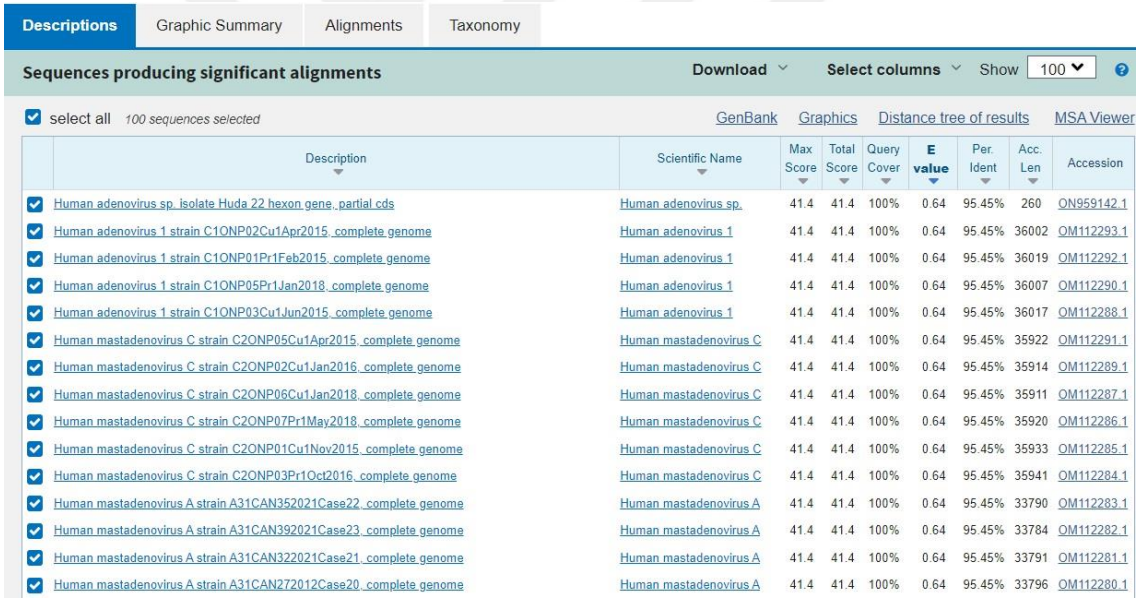
- Literatür taramaları sonucunda insan adenovirus DNA'sını saptayabilecek pan-HAdV primer dizilerinin ve probun belirlenmesi,
- Belirlenen primer ve prob sekanslarının biyoinformatik analizi ve hedef gen dizilerin tayini,
- HAdV DNA'sına ait hekzon gen bölgesinin, klonlanması, izole edilmesi ve florometre ile kantitasyonu,
- Kantite edilen HAdV DNA'sından, DNA miktarı bilinen dilüsyonların hazırlanması,
- Hazırlanan dilüsyonların, tez çalışması için sentezletilen primer ve prob dizileri ile real-time PCR testinin üçer tekrarlı olarak gerçekleştirilmesi,
- Hazırlanan dilüsyonların sentezletilen primer ve prob dizileri kullanılarak birbirinden bağımsız üç oturumda üçer tekrarlı olarak dijital PCR testlerinin gerçekleştirilmesi,
- Dijital PCR ve real-time PCR test sonuçlarının karşılaştırılması, R kare analizi,
- Geliştirilen testin performansının sınanması.

3.2.1. HAdV primer ve prob dizilerinin belirlenmesi, biyoinformatik analiz ve hedef gen dizilerinin tayini

Bu tez çalışmasında öncelikli olarak kemik iliği transplant alıcılarında ve immun yetersiz hastalarda en sık karşılaşılan adenovirus tipleri üzerinde yoğunlaşılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında bu hasta gruplarında en sık HAdV tür A, B ve C saptanmıştır.[126–128] Bu bilgiden yola çıkarak, bu üç grubu ve diğer adenovirus tiplerini aynı anda saptayabilecek, insan adenovirusu hekzon gen bölgesini hedefleyen primer dizileri seçildi (Tablo 3-1). Seçilen primerlerin hedef mikroorganizmaya uygunluğunu doğrulamak amacıyla nBLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) sisteminden (Şekil 3.1), hedef gen dizisini belirlemek amacı ile ise BioEdit yazılımından (şekil 3.2) yararlanıldı ve 69 bp'lik bir baz dizisi olduğu belirlendi. Hem real-time PCR, hem dPCR çalışmasında floresan işaretleme için, seçilen dizilere özgü prob kullanıldı.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan primer ve prob dizileri[129]

AdV F	CAGGACGCYTCGGAGTACCTGA
AdV RI	CGGTGGTCACATCGTGGGT
AdV RII	GCTGAAGTACGTVTCGGTGGC
AdV RIII	GGTGAAGTAGGTGTCCGTGGC
AdV prob	**FAM**-TGGTGCAGTTYGCCCG-**BHQ 1**



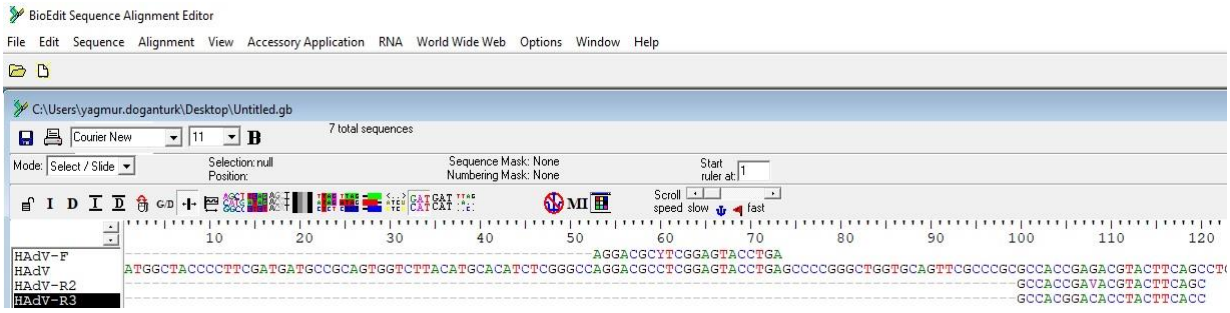
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Human adenovirus sp. isolate Huda 22 hexon gene, partial cds	Human adenovirus sp.	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	260	ON959142.1
Human adenovirus 1 strain C1ONP02Cu1Apr2015, complete genome	Human adenovirus 1	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	36002	OM112293.1
Human adenovirus 1 strain C1ONP01Pr1Feb2015, complete genome	Human adenovirus 1	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	36019	OM112292.1
Human adenovirus 1 strain C1ONP05Pr1Jan2018, complete genome	Human adenovirus 1	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	36007	OM112290.1
Human adenovirus 1 strain C1ONP03Cu1Jun2015, complete genome	Human adenovirus 1	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	36017	OM112288.1
Human mastadenovirus C strain C2ONP05Cu1Apr2015, complete genome	Human mastadenovirus C	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	35922	OM112291.1
Human mastadenovirus C strain C2ONP02Cu1Jan2016, complete genome	Human mastadenovirus C	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	35914	OM112289.1
Human mastadenovirus C strain C2ONP06Cu1Jan2018, complete genome	Human mastadenovirus C	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	35911	OM112287.1
Human mastadenovirus C strain C2ONP07Pr1May2018, complete genome	Human mastadenovirus C	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	35920	OM112286.1
Human mastadenovirus C strain C2ONP01Cu1Nov2015, complete genome	Human mastadenovirus C	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	35933	OM112285.1
Human mastadenovirus C strain C2ONP03Pr1Oct2016, complete genome	Human mastadenovirus C	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	35941	OM112284.1
Human mastadenovirus A strain A31CAN352021Case22, complete genome	Human mastadenovirus A	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	33790	OM112283.1
Human mastadenovirus A strain A31CAN392021Case23, complete genome	Human mastadenovirus A	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	33784	OM112282.1
Human mastadenovirus A strain A31CAN322021Case21, complete genome	Human mastadenovirus A	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	33791	OM112281.1
Human mastadenovirus A strain A31CAN272012Case20, complete genome	Human mastadenovirus A	41.4	41.4	100%	0.64	95.45%	33796	OM112280.1

Şekil 3-1: BLAST ile örnek primer dizilerinin doğrulanması



Şekil 3-2: Bioedit yazılımı ile hedef gen dizinin belirlenmesi

3.2.2. Standart HAdV DNA'sının hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan adenovirus DNA'sı hekzon gen bölgesi, laboratuvarımızda QIAstat-Dx (Qiagen, Almanya) multipleks real-time PCR cihazında adenovirus pozitif saptanan ve -20 derecede arşivlenmiş olan nazofarinks sürüntü örneklerine ait ekstraksiyon ürünlerinden klonlanarak elde edildi. Prosedüre uygun olarak, arşivden çıkarılan DNA ekstraksiyonları öncelikle oda ısısına getirildi. Ardından çalışma için sentezletilen primer ve prob dizileri kullanılarak adenovirus DNA'sına ait 69 bp'lik bölge, real-time PCR yöntemi ile çoğaltıldı. İşlemin ardından PCR ürünlerinden, manyetik boncuklar kullanılarak DNA prüfikasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen prüfikasyon ürünlerinden bir havuz oluşturuldu. Hazırlanan bu havuz ana stok olarak saklandı. Havuzlanan ana stoktaki DNA miktarını (nanogram/µl) tayin etmek amacıyla Qubit florometre kullanıldı.

Prüfikasyon işlemi için manyetik boncuklar (Kapa Pure Beads, Roche, Güney Afrika) kullanıldı. İşleme başlamadan önce manyetik boncuklar oda ısısına getirildi.

- 1,5 ml'lik kapaklı tüpler içine 30 µl DNaz/RNaz içermeyen saf su eklendi. Ardından her bir tüpe 20 µl PCR ürünü ve 30 µl manyetik boncuk eklenerek oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyonun ardından tüpler manyetik standa yerleştirilerek 2 dakika boyunca PCR ürünlerinin manyetik boncuklara yapışması sağlandı.

- İnkübasyon sonunda süpernatant atıldı. Boncukların üzerine 200 µl %80'lik etanol eklenerek yıkama işlemi yapıldı. 30 saniye ardından etanol ortamdan uzaklaştırılarak aynı işlem tekrar edildi. İkinci işlemin ardından etanol ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kurutma işlemi gerçekleştirildi (3-5 dakika).

- 40 µl DNaz/RNaz içermeyen saf su eklenerek manyetik boncuklar çözdürüldü, pipetaj yapıldı ve oda ısısında 2 dakika inkübe edildi (elüsyon aşaması).

- Tüpler manyetik stant üzerinde 2 dakika bekletildi ve ardından 35 µl'si steril tüplere aktarılarak saflaştırma işlemi tamamlandı.

3.2.3. Saflaştırılan DNA'nın ölçümü

Saflaştırma işlemi tamamlanan HAdV DNA hekzon bölgelerindeki DNA miktarı tayin edildi. Ölçüm işlemleri 0,5 µl'lik steril tüplerde gerçekleştirildi. Ölçüm işlemi için Qubit 3 Fluorometer (Thermo Scientific, ABD) cihazı ve Accu Green High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium, ABD) kullanıldı. Kit kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Ölçüm işlemi sonucunda örneklerden DNA havuzu oluşturuldu.

- Prosedüre uygun olarak izole edilen DNA'ların ölçümü için 199 µl, standartlar için (2 adet) ise 190 µl tampon (qubit buffer) hazırlandı (tampon ve standartlar kit içeriğinde mevcut).

- [(199 × (n+1)) + (190 ×2)] µL Buffer + [((n+1)+2) × 1] µL formülü ile SYBR Aqua Green ile karışım hazırlandı (n, örnek sayısı).

- Karışımlar 2-3 saniye vortekslendi.

- Karışımlar karanlık ortamda oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.

- Her bir örnek için 198 µl, her bir standart için ise 190 µl mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

- Örnekler için ayrılan karışımlara 2'şer µl örnek (her bir örnek için 198 µl + 2 µl), standartlar için ise 10 µl standart eklendi (her bir standart için 190 µl + 10 µl).

- İşlemin ardından tüpler karanlık ortamda oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

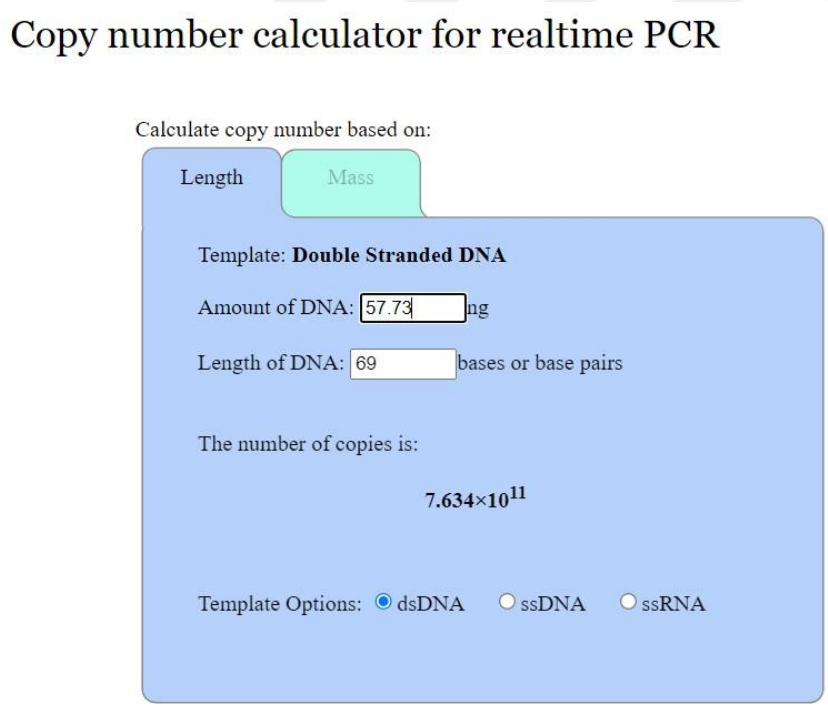
- Qubit 3 Fluorometer (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak ilk olarak standartların ölçümü gerçekleştirildi ve sonuçlar kaydedildi.

- Ardından izole edilen DNA konsantrasyonlarının ölçümü gerçekleştirilerek birim hacimdeki DNA miktarı ng/ml cinsinden tayin edildi.

3.2.4. DNA miktarı bilinen dilüsyonların hazırlanması

Saflaştırma işlemi tamamlanan HAdV DNA hekzon bölgeleri steril bir PCR tüpü içerisinde birleştirilerek bir havuz oluşturuldu ve ana stok olarak kullanıldı. Hazırlanan ana stoğun HAdV DNA konsantrasyonu Qubit florometre yöntemi ile 57,73 ng/ml olarak ölçüldü. Florometrede elde edilen bu değer ve çoğaltılan bölgenin sekans uzunluğundan (69 bp) yararlanarak, hazırlanan stok solüsyondaki HAdV DNA'nın real-time PCR için mililitredeki kopya sayısı teorik olarak hesaplandı (http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr) (Şekil 3.3). Buna göre hazırlanan stok solüsyondaki DNA kopya sayısı aşağıdaki formüle göre 7,634x10^{11} kopya/ml olarak hesaplandı.

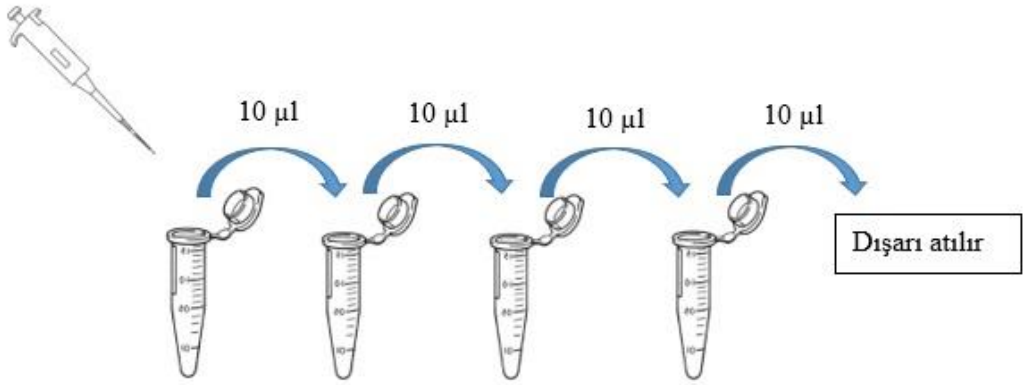
$$\text{Kopya sayısı} = \frac{\text{ng miktarı} * 6{,}022x10\text{^}23}{DNA\ uzunluğu - 1x10\text{^}9 * 660}$$



Şekil 3-3: Real-time PCR için kopya sayısının teorik hesaplanması

Florometrede DNA miktarı belirlenen ana stok, real-time PCR ve dijital PCR çalışmalarını gerçekleştirmek üzere 1/10 sulandırılarak ardışık dilüsyonlar hazırlandı (Şekil 3.4). Hazırlanan dilsüyonlar -20^{o}C'de muhafaza edilerek her çalışma öncesi dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığında çözdürüldü. Dijital PCR çalışmalarından önce tablo 3-1'deki

primer ve prob dizileri kullanılarak hazırlanan dilüsyonların real-time PCR işlemi gerçekleştirildi ve eşik döngü değeri (cycle of treshold, CT) belirlendi. Dijital PCR test formatının anlamlı bir şekilde geliştirilebilmesi için, elde edilen sonuçlar doğrultusunda, çalışma formatına uygun olarak (kullanılan dijital PCR yönteminin üst saptama sınırı 10.000 kopya/µl olduğundan) DNA miktarını optimum düzeyde içeren ve yaklaşık DNA kopya sayısı 76.340 kopya/ml olduğu hesaplanan dilüsyondan itibaren CT değerleri azalarak devam eden onar kat sulandırımlı ardışık 4 dilüsyon seçilerek çalışıldı.



Şekil 3-4: DNA miktarı bilinen dilüsyonların hazırlanması

- Tüplerin her birine 90 µl DNaz/RNaz içermeyen su koyulur,
- İlk tüpe 10 µl HAdV DNA eklenir,
- Pipetaj yapılarak homojen bir karışım oluşturulur ve içerisinden 10 µl alınarak ikinci tüpe aktarılır.
- İşlem her bir tüp için tekrar edilir.

Buna göre hazırlanan ardışık dilüsyonların içerdiği HAdV DNA yaklaşık kopya sayıları;

- Dilüsyon 1 (D1)→76.340 kopya/ml
- Dilüsyon 2 (D2)→7.634 kopya/ml
- Dilüsyon 3 (D3)→763,4 kopya/ml
- Dilüsyon 4 (D4)→76,34 kopya/ml olarak hesaplandı.

3.2.5. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması ve Dijital PCR ve Real-Time PCR Testlerinin Gerçekleştirilmesi

Bir laboratuvarda yeni bir test yönteminin geliştirilebilmesi için validasyon ve verifikasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi gereklidir. Validasyon ve verifikasyon çalışmaları için; dinamik aralık, saptama sınırı (limit of detection, LoD), hassasiyet [kantitasyon sınırı (limit of quantification, LoQ)], kesinlik ve tekrarlanabilirlik parametreleri sağlanmalıdır.[120,121,124,130] Bu bağlamda tez çalışmasında bu parametreleri sağlamak amacıyla HAdV DNA'sının onar kat sulandırımlı dört dilüsyonu, birbirinden bağımsız üç oturumda üçer tekrarlı olarak çalışıldı.

Çalışmada kullanılan primerler 100 pmol/ml olacak şekilde sulandırıldı ve stoklandı. Deneyler için primerler 20 pmol/ml olacak şekilde DNaz/RNaz içermeyen su ile karışım hazırlanarak çalışıldı (Tablo 3-2) ve hem dijital PCR hem de real-time PCR reaksiyonları dijital PCR protokolüne uygun olacak şekilde tek bir protokol üzerinden gerçekleştirildi (Tablo 3-3 ve Tablo 3-4).[109,131]

Tablo 3-2: Primerlerin ve probun hazırlanması

AdV F	0,96 µl
AdV RI	0,96 µl
AdV RII	0,96 µl
AdV RIII	0,96 µl
AdV prob	0,96 µl
Toplam	**4,32 µl**
DNaz/RNaz içermeyen su	**5,68 µl**

10 µl (reaksiyon başına 0,25 µl)

40 µl'lik primer-prob karışımı için 30 µl saf su eklendi (reaksiyon başına 1 µl)

Tablo 3-3: Real-time PCR ve Dijital PCR çalışması için hazırlanan reaksiyon karışımı (1 örnek için)[109,131]

	Real-time PCR	**Dijital PCR (26k)**
DNaz/RNaz içermeyen su	3 µl	9,3 µl
4x prob PCR master mix	3 µl	10 µl
Primer-prob mix	1 µl	4 µl
HAdV DNA	5 µl	16,7 µl
Toplam	**12 µl**	**40 µl**

Tablo 3-4: Dijital PCR ve real-time PCR çalışmaları için kullanılan ısı profili [109,131]

Aşama	**Süre**	**Sıcaklık (°C)**
PCR başlangıç	2 dakika	95
Denatürasyon	15 saniye	95
Birleşme/Uzama	30 saniye	60*

45 döngü*

*Birleşme/Uzama sıcaklığı ve döngü sayıları test türüne göre değişiklik gösterebilir.

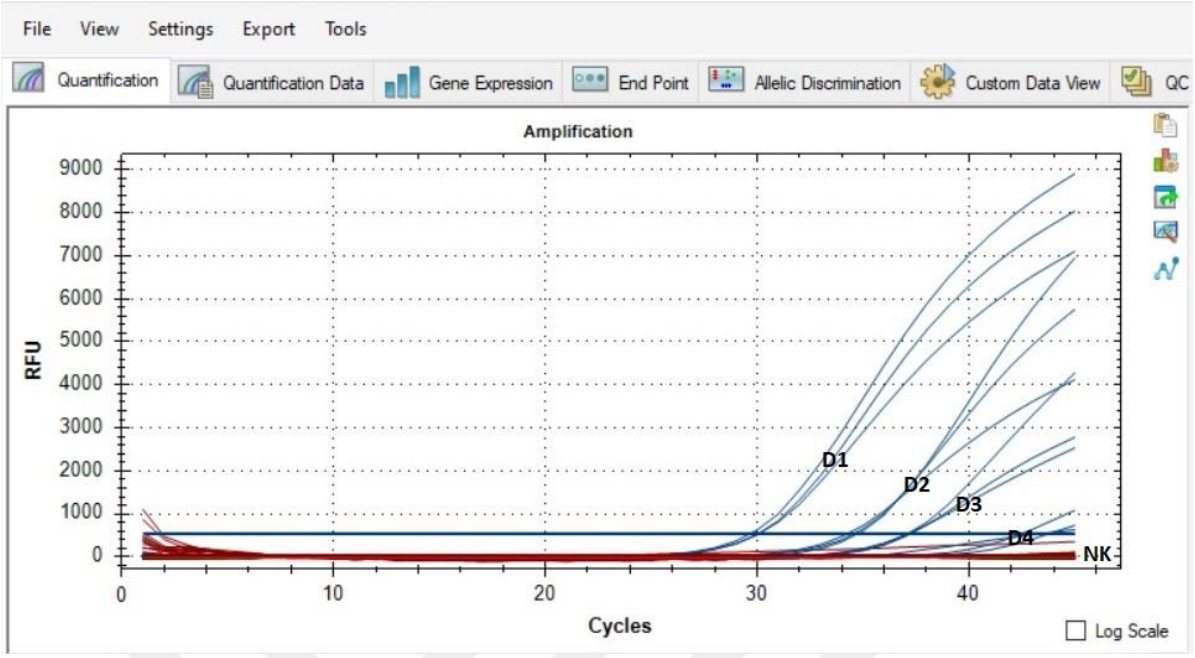
4. BULGULAR

DNA miktarı bilinen dilüsyonlar için sırasıyla real-time PCR ve dijital PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Real-time PCR testi için çalışmaya uygun olarak seçilen ardışık dört dilüsyon tek oturumda üçer tekrarlı olarak çalışılırken, yeni geliştirilen bir test formatı için uygulanması gereken validasyon-verifikasyon kuralları doğrultusunda dinamik aralık, saptama sınırı (limit of detection, LoD), hassasiyet [kantitasyon sınırı (limit of quantification, LoQ)], kesinlik ve tekrarlanabilirlik parametrelerini sağlayabilmek amacıyla, dijital PCR testleri bağımsız üç farklı oturumda, üçer tekrarlı olarak çalışıldı.

4.1. Çalışma Sonuçları

4.1.1. Real-time PCR test sonuçları

Tez çalışması kapsamında belirlenen ve sentezlenen primer ve prob dizileriyle dört dilüsyonun üçer tekrarlı real-time PCR testi gerçekleştirildi ve CT değerleri belirlendi. Buna göre teorik olarak kabaca 76.340 kopya/ml HAdV DNA içerdiği tahmin edilen ilk dilüsyonun CT değeri 31; 7634 kopya/ml HAdV DNA içerdiği tahmin edilen ikinci dilüsyonun CT değeri 35; 763,4 kopya/ml HAdV DNA içerdiği tahmin edilen üçüncü dilüsyonun CT değeri 37 ve 76,34 kopya/ml HAdV DNA içerdiği tahmin edilen dördüncü dilüsyonun CT değeri 43 olarak belirlendi (Şekil 4.1).

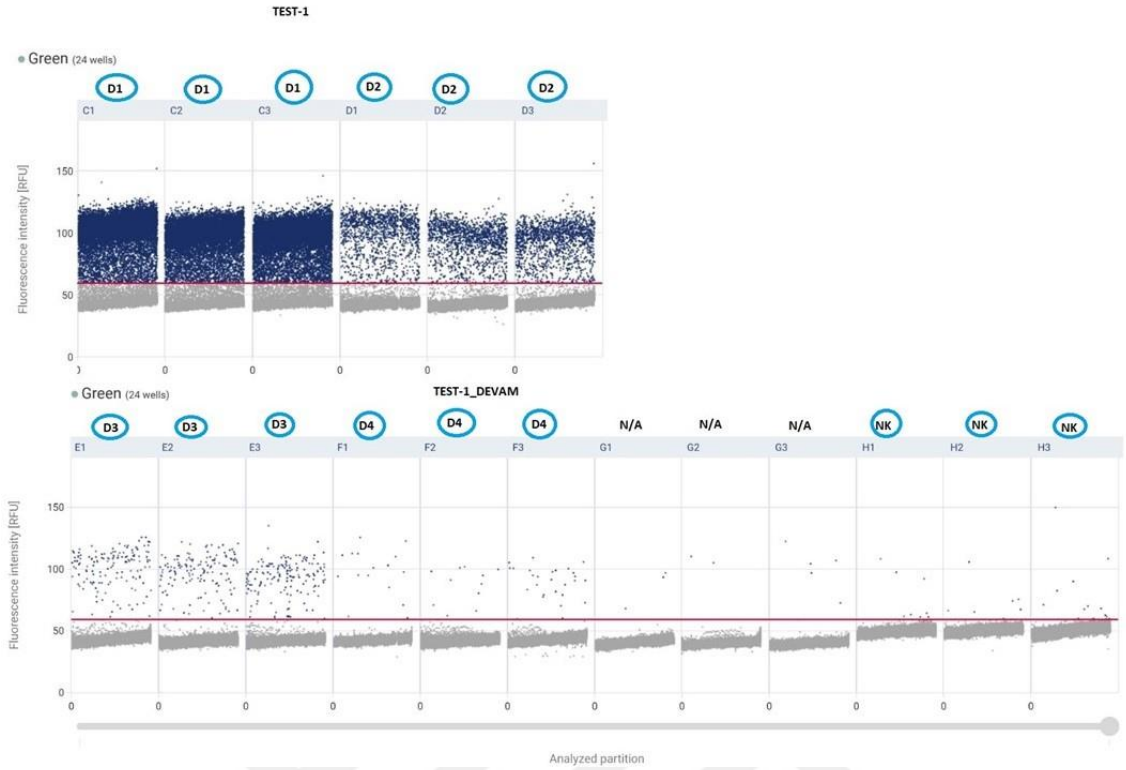


Şekil 4-1: Real-time PCR test sonuçları (D1: 31; D2: 35; D3: 37; D4: 43; NK: negatif kontrol)

4.1.2. Dijital PCR test sonuçları

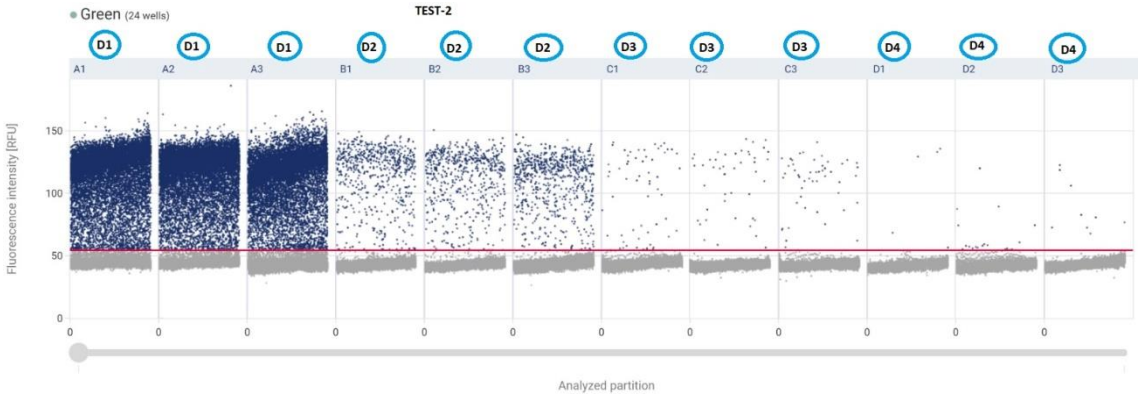
Adenovirusun dijital PCR tabanlı test formatının geliştirilebilmesi amacıyla validasyon-verifikasyon kuralları doğrultusunda; ardışık dört dilüsyon üç ayrı oturumda üçer tekrarlı olarak dijital PCR testi ile çalışıldı.

Test sonuçlarına göre birinci oturumda; real-time PCR'da CT değeri 31 olarak belirlenen (real-time PCR'da yaklaşık 76.340 kopya/ml) birinci dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 817,4 kopya/µl, 750,7 kopya/µl ve 870,2 kopya/µl; CT değeri 35 olarak belirlenen ikinci dilüsyonun (real-time PCR'da yaklaşık 7.634 kopya/ml) dPCR çalışmasında tekrarları 74,38 kopya/µl, 74,66 kopya/µl ve 78,93 kopya/µl; CT değeri 37 olarak belirlenen (real-time PCR'da yaklaşık 763,4 kopya/ml) üçüncü dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 7,329 kopya/µl, 6,783 kopya/µl ve 7,953 kopya/µl; CT değeri 43 olarak belirlenen (real-time PCR'da yaklaşık 76,34 kopya/ml) dördüncü dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 0,788 kopya/µl, 0,574 kopya/µl ve 1,374 kopya/µl olarak saptandı (Şekil 4.2).



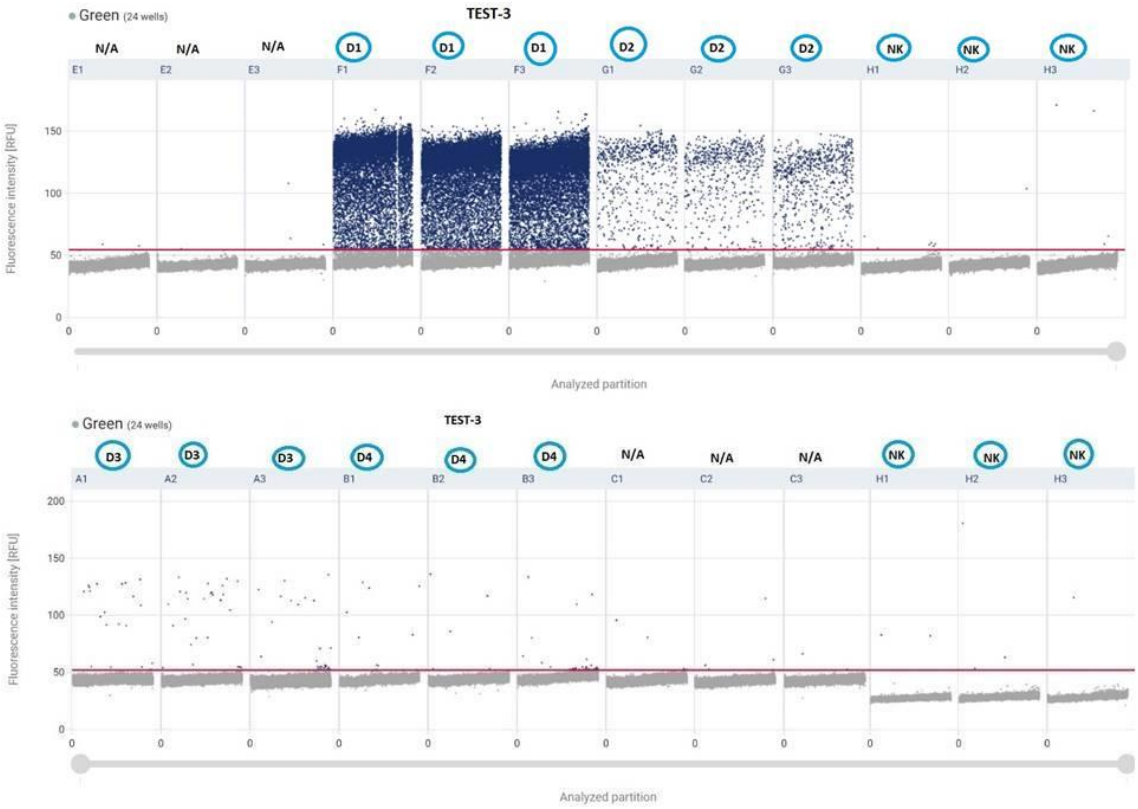
Şekil 4-2: Adenovirus dilüsyonlarının ve tekrarlarının dijital PCR sisteminde sonuçları (1) (D1: dilüsyon 1, D2: dilüsyon 2, D3: dilüsyon 3, D4: dilüsyon 4, N/A: mevcut değil, NK: negatif kontrol)

Test sonuçlarına göre ikinci oturumda; birinci dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 785,000 kopya/µl, 797,600 kopya/µl ve 744,800 kopya/µl; ikinci dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 30,960 kopya/µl, 28,480 kopya/µl ve 35,020 kopya/µl; üçüncü dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 2,873 kopya/µl, 2,203 kopya/µl ve 2,432 kopya/µl; dördüncü dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 0,245 kopya/µl, 1,040 kopya/µl ve 0,440 kopya/µl olarak saptandı (Şekil 4.3).



Şekil 4-3: Adenovirus dilüsyonlarının ve tekrarlarının dijital PCR sisteminde sonuçları (2)

Test sonuçlarına göre üçüncü oturumda; birinci dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 717,200 kopya/µl, 685,300 kopya/µl ve 765,800 kopya/µl; ikinci dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 31,820 kopya/µl, 28,010 kopya/µl ve 35,710 kopya/µl; üçüncü dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 0,958 kopya/µl, 1,293 kopya/µl ve 1,442 kopya/µl; dördüncü dilüsyonun dPCR çalışmasında tekrarları 0,528 kopya/µl, 0,253 kopya/µl ve 3,286 kopya/µl olarak saptanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4-4: Adenovirus dilüsyonlarının ve tekrarlarının dPCR sisteminde sonuçları (3)

Dijital PCR ile elde edilen tüm test sonuçları bütünleşik olarak tablo 4-1'de verilmiştir:

Tablo 4-1: Bütünleşik tablo: Tüm dilüsyonların dijital PCR ile elde edilen kantitatif sonuçları (kopya/µl)

	Çalışma 1				**Çalışma 2**			
	D1	**D2**	**D3**	**D4**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**
1.tekrar	817,4	74,38	7,329	0,788	785,0	30,96	2,873	0,245
2.tekrar	750,7	74,66	6,783	0,574	797,6	28,48	2,203	1,04
3.tekrar	870,2	78,93	7,953	1,374	744,8	35,02	2,432	0,44

	Çalışma 3			
	D1	**D2**	**D3**	**D4**
1.tekrar	717,2	31,82	0,958	0,528
2.tekrar	685,3	28,01	1,293	0,253
3.tekrar	765,8	35,71	1,442	3,286

4.2. Sonuçların Analizi

4.2.1. PCR verimliliği

Bu tez çalışmasında PCR verimliliğini belirlemek amacıyla, hazırlanan dilüsyonlar real-time PCR yöntemi ile test edilerek CT değerleri saptandı. Standart eğim y = mx + b (y: CT değeri, m: slope, b: intercept, x: logaritmik hedef miktarı) denklemi kullanılarak; PCR verimliliği ise $E = 10^{-1/m} - 1$ (E: verimlilik, m: doğrusal standart eğrinin eğimi) denklemi kullanılarak hesaplanır. Buna göre yapılan çalışmada birinci dilüsyondan dördüncü dilüsyona (D1-D4) kadar CT değerleri sırasıyla 31, 35, 37 ve 43 olarak saptandı ve real-time PCR'daki verimliliği %109,6 olarak hesaplandı. Dijital PCR yöntemi kantitatif sonuç verdiğinden ve bir standart eğriye gerek duyulmadığından, real-time PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlar, hazırlanan dilüsyonların ve çalışma için seçilen pirmer-probların verimliliğini gözlemlemek ve dPCR test sonuçlarını karşılaştırma amacıyla referans olarak değerlendirildi.

4.2.2. Geliştirilen testin tekrarlanabilirliği ve hassasiyet-prezisyonu

Bu tez çalışmasında testin tekrarlanabilirliğini ve hassasiyetini ölçebilmek amacıyla adenovirus DNA'sı 1/10 olacak şekilde sulandırılarak, uygun konsantrasyonlardaki ardışık dört dilüsyon, bağımsız üç ayrı oturumda üçer tekrarlı olarak çalışıldı. İstatistiksel analizler GraphPad yazılımı ile gerçekleştirildi. Buna göre test içi ve testler arası ortalama değer, standart sapma değerleri ve varyasyon katsayıları tablo 4-2, tablo 4-3, tablo 4-4 ve tablo 4-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4-2: Birinci oturum dPCR sonuçlarının test içi analizi

Birinci oturum	**1_D1**	**1_D2**	**1_D3**	**1_D4**
Dilüsyon tekrarlar sayısı	3	3	3	3
Minimum	751	74,4	6,78	0,574
Maksimum	870	78,9	7,95	1,37
Aralık değeri	120	4,55	1,17	0,8
Ortalama	813	76	7,36	0,912
Standart sapma	59,9	2,55	0,585	0,414
Ortalamanın std hatası	34,6	1,47	0,338	0,239
Düşük %95 güven aralığı	664	69,7	5,9	-0,117
Yüksek %95 güven aralığı	962	82,3	8,81	1,94
Varyasyon katsayısı	7,37%	3,36%	7,96%	45,40%

Tablo 4-3: İkinci oturum dPCR sonuçlarının test içi analizi

İkinci oturum	**2_D1**	**2_D2**	**2_D3**	**2_D4**
Dilüsyon tekrarlar sayısı	3	3	3	3
Minimum	745	28,5	2,2	0,245
Maksimum	798	35	2,87	1,04
Aralık değeri	52,8	6,54	0,67	0,795
Ortalama	776	31,5	2,5	0,575
Standart sapma	27,6	3,3	0,341	0,414
Ortalamanın std hatası	15,9	1,91	0,197	0,239
Düşük %95 güven aralığı	707	23,3	1,66	-0,454
Yüksek %95 güven aralığı	844	39,7	3,35	1,6
Varyasyon katsayısı	3,55%	10,50%	13,60%	72,10%

Tablo 4-4: Üçüncü oturum dPCR sonuçlarının test içi analizi

Üçüncü oturum	**3_D1**	**3_D2**	**3_D3**	**3_D4**
Dilüsyon tekrarlar sayısı	3	3	3	3
Minimum	685	28	0,958	0,253
Maksimum	766	35,7	1,44	3,29
Aralık değeri	80,5	7,7	0,484	3,03
Ortalama	723	31,8	1,23	1,36
Standart sapma	40,5	3,85	0,248	1,68
Ortalamanın std hatası	23,4	2,22	0,143	0,968
Düşük %95 güven aralığı	622	22,3	0,615	-2,81
Yüksek %95 güven aralığı	823	41,4	1,85	5,52
Varyasyon katsayısı	5,61%	12,10%	20,10%	124%

Tablo 4-5: Tüm testler arası sonuçların değerlendirilmesi

Testler Arası	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**
Dilüsyon tekrarlar sayısı	9	9	9	9
Minimum	685,3	28,01	0,958	0,245
Maksimum	870,2	78,93	7,953	3,286
Aralık değeri	184,9	50,92	6,995	3,041
Ortalama	770,4	46,44	3,696	0,9476
Standart sapma	55,07	22,34	2,822	0,9509
Ortalamanın std hatası	18,36	7,448	0,9406	0,317
Düşük %95 güven aralığı	728,1	29,27	1,527	0,2166
Yüksek %95 güven aralığı	812,8	63,62	5,865	1,678
Varyasyon katsayısı	7,15%	48,11%	76,35%	100,40%

4.2.3. Geliştirilen testin doğruluğu

Buna göre adenovirusun tanısına yönelik geliştirilen bu test formatının doğruluğunu saptamak amacıyla bir seri dilüsyon hazırlandı ve referans olarak real-time PCR yöntemi ile test edildi. Dijital PCR yöntemi ile saptanan kantitatif sonuçlar, Qubit ile teorik olarak hesaplanan DNA miktarı ve real-time PCR yöntemiyle elde edilen CT değerleri ile karşılaştırıldı. Buna göre testin doğruluğunu gözlemlemek üzere; http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr ile teorik olarak hesaplanan DNA miktarları, CT değerleri ve dijital PCR ile elde edilen testler arası ortalama kantitatif değerler tablo 4-6'de bütünleşik olarak verilmiştir.

Tablo 4-6: Dilüsyonların teorik kopya sayıları, CT değerleri ve dPCR sonuçlarının karşılaştırılması

	Real-time PCR için teorik hesaplanan DNA kopya sayısı (kopya/ml)	**Real-time PCR CT değerleri (ortalama)**	**Dijital PCR testler arası ortalama kopya değerleri (kopya/µl)**
D1	76340	31	770,4
D2	7634	35	46,44
D3	763,4	37	3,696
D4	76,34	43	0,9476

4.2.4. Geliştirilen testin dinamik aralığı

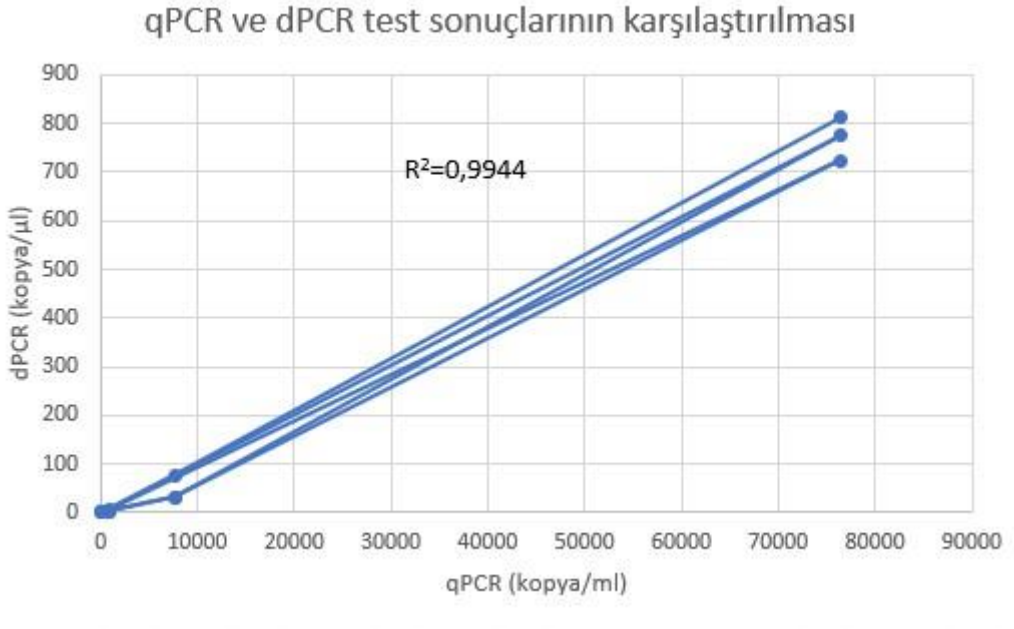
Dinamik aralık, hedef nükleik asit dizisinin güvenilir bir şekilde tespit edileceği konsantrasyon aralığıdır. Bu çalışmada geliştirilen testin dinamik aralığı 770,4-0,9476 kopya/µl olarak belirlendi.

4.2.5. Analitik duyarlılık (LoD) ve kantitasyon sınırı (LoQ)

Bu tez çalışmasında geliştirilen testin LoD ve LoQ değerleri eşit olup; değeri 0,9476 kopya/µl olarak belirlendi.

4.2.6. R kare analizi

R^2 analizi için dPCR ile üç ayrı oturumda üçer tekrarlı olarak çalışılan dört dilüsyonun kantitatif sonuçlarıyla, CT değerlerini temsil eden teorik real-time PCR kopya sayıları karşılaştırıldı. Analiz Microsoft Excel programı ile gerçekleştirildi. Buna göre geliştirilen testin R^2 değeri 0,9944 olarak belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4-5: qPCR ve dPCR test sonuçlarının karşılaştırılması ve R^2 analizi

5. TARTIŞMA

Adenovirus infeksiyonları özellikle hematopoetik kök hücre transplantasyonu ardından komplikasyonlarla, hatta mortalite ile sonuçlanabilmektedir. Transplantasyon sonrası erken dönemde ilk 100 gün boyunca CD4 ve CD8 T lenfositlerinin yetersiz çalışmasından ve buna bağlı olarak immun sistemin zayıflaması nedeniyle adenoviral infeksiyon reaktivasyonu gerçekleşmektedir.[5,18] Bu hastalarda enterit, hamorajik sistit ve hepatit gelişebilmektedir.[132–139] İnfeksiyon sıklığı yetişkinlerde %3-15 oranında, pediatrik alıcılarda ise %6-42 oranında görülmekte, özellikle de pediatrik kök hücre transplantasyon alıcılarında ciddi komplikasyonlara sebep olabilmektedir.[7–9] Periferal kan örneğinde HAdV saptanan pediatrik KİT alıcılarının %82'sinde infeksiyon mortalite ile sonuçlanmaktadır.[10] Transplantasyon sonrası gelişen adenovirus infeksiyonlarının, transplant alıcılarındaki farklı klinik yansımalarını anlayabilmek amacı ile öncelikle adenovirus saptama ve infeksiyon yönetiminin anlaşılması gerekmektedir.[18]

Transplant alıcılarında adenovirus infeksiyonuna bağlı riskleri önleyebilmek amacı ile adenovirus izlemi ve tedavisi için çeşitli öneri kılavuzları geliştirilmiştir.[140–143] Bu önerilere göre; transplant alıcısında adenovirus viral yükünün >1000 kopya/ml olması ile simültane lenfosit sayısının mikrolitrede <300 olması ve CD3+ T lenfosit sayısının mikrolitrede <25 olduğu durumlarda transplant alıcısı dissemine adenoviral infeksiyon açısından yüksek riskli kabul edilmelidir. Dissemine adenovirus infeksiyonu gelişen transplant alıcılarında mortalite seviyesi %70'lere kadar çıkabildiğinden hasta acilen tedavi edilmelidir. Viral yükün <1000 kopya/ml olduğu durumlarda ise yüksek duyarlılıkta hassas PCR tekniklerinden yararlanılmalıdır.[75,144,145]

Günümüzde infeksiyon hastalıklarının tanı ve takibinde kullanılmaya devam eden konvansiyonel PCR ve qPCR yöntemleriyle kıyaslandığında, dijital PCR yöntemleri (çip veya damlacık tabanlı) pek çok avantaja sahiptir. qPCR yönteminde çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışıma veren boyalar veya prob sistemi kullanılır ve her bir döngü sonunda bu ışımalar monitörize edilir. Bağlanan floresan boyanın yoğunluğuna göre bir standart eğri oluşur ve viral nükleik asidin varlığı ve yoğunluğu bu standart eğriler sayesinde belirlenir. qPCR yönteminde standart eğrilere mutlaka ihtiyaç duyulmaktadır ancak ortaya çıkan eğrilerin laboratuvardan laboratuvara ve testi gerçekleştiren personele göre değişiklikler göstermesi; ek olarak, mutlak kantitatif sonuç elde edilememesi bu yöntemin kısıtlılıklarındandır.[114,146] Dijital

PCR yönteminde standart eğriye ihtiyaç duyulmaması ve mutlak kantitatif sonuç vermesi, bu yöntemi diğer PCR yöntemlerinden avantajlı kılmaktadır. Ayrıca bugüne kadar yayınlanmış olan literatürlerde hedef miktarının düşük olduğu durumlarda dijital PCR'ın diğer PCR yöntemlerinden daha hassas olduğu ve analitik duyarlılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir.[114,116,155–158,147–154]

Kantitatif Dijital PCR uygulamalarına yönelik asgari bilgilendirme kılavuzlarının (dMIQE) yayınlanmasından bu yana, dPCR yönteminin yeni uygulamalarıyla ile ilgili hatırı sayılır derecede teknolojik gelişme kaydedilmiştir. dPCR pahalı ve kısıtlı uygulama alanlarında birkaç laboratuvarda kullanılan bir teknoloji olmaktan çıkıp, diğer PCR tekniklerine göre benzersiz avantajları nedeniyle uygulama kapasitesi genişlemiştir.[104,159,160] dPCR kantitatif sonuç vermesi ve düşük DNA kopya sayılarında dahi örneği nano hacimli partisyonlara bölerek her partisyonda ayrı ayrı amplifikasyon gerçekleşmesini sağlaması nedeniyle qPCR yöntemi ile kıyaslandığında daha hassas ve daha kesin sonuçlar vermektedir. dPCR yönteminde çip tabanlı cihazlarda alt saptama sınırı 1 kopya/µl iken, üst saptama sınırı partisyon sayısına paralel olarak 10.000 kopya/µl olup, bu kopya sayısının üzerinde hedef DNA molekülü içeren testler yeteri kadar fazla partisyona bölünememekte ve fazla ışımaya sebep olduğundan kantitatif ölçüm gerçekleştirilememektedir. Ancak son dönemlerde yeni gelişmelerle birlikte 10.000 kopyadan daha fazla partisyona ayırabilen ve bu sayede testin dinamik aralığının genişlemesine katkıda bulunan cihazlar da geliştirilmektedir.[104,114,161]

Belirtilen bilgiler ışığında; dijital PCR'ın avantajları göz önünde bulundurulduğunda insan adenovirusun mutlak kantitasyonuna elverişli herhangi bir ticari dPCR kiti ve uygulaması bulunmaması nedeniyle, özellikle pediatrik KİT alıcılarında transplantasyon sonrası erken dönemde adenovirusun kantitatif tanısı ve takibine katkı sağlayabilmek amacıyla bu tez çalışmasında adenovirusun kantitasyonuna yönelik dPCR temelli bir sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Arvia ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş (FFPE) kutanöz biyopsi örneklerinde hem ddPCR hem de qPCR yöntemi ile Merkel hücre polyomavirus (MCPyV) DNA'sı araştırılmış ve elde edilen sonuçlar yöntemler arası karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamamızda da olduğu gibi bu çalışmada da testlerin analitik duyarlılık, doğrusallık, dinamik aralık test içi ve testler arası tekrarlanabilirliğini saptamak üzere hedef DNA içeren stok solüsyonu onar kat dilüe ederek üç

bağımsız oturumda, üçer tekrarlı olarak çalışılmış ve ana stokta bulunan DNA konsantrasyonu PCR testlerinden önce nanodrop spektrofotometre ile ölçülmüştür. Elde ettikleri sonuçlara göre her iki metodun da doğrusallığının ve tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu bildirilmiştir ancak qPCR ile MCPyV negatif saptanan bazı numunelerin ddPCR ile saptanabildiğini, buna göre duyarlılığının daha yüksek olduğu; ayrıca düşük kopya sayıları saptamakta da daha başarılı olduğu bildirilmiş ve R kare analizi 0,9996 olarak hesaplanmıştır. Ek olarak ddPCR yönteminin qPCR'a kıyasla PCR inhibitörlerinden daha az etkilendiği bildirilmiştir.[116] Ne var ki, hedef DNA kopya sayısının reaksiyon başına $\geq 10^5$ olduğu durumlarda qPCR'ın dinamik aralığı doğrusallığını korurken, ddPCR bu kopya sayılarında yüksek saturasyona uğrayarak kantitatif veri sağlayamamaktadır.[116,162,163]

Yapılan bu tez çalışmasında geliştirilen testin analitik duyarlılığını, doğrusallığını, dinamik aralığını ve test içi ve testler arası tekrarlanabilirliğini saptayabilmek amacı ile hedef DNA içeren stok solüsyon onar kat dilüe ederek üç bağımsız oturumda, üçer tekrarlı olarak çalışılmıştır. Ana stokta bulunan DNA konsantrasyonu PCR testlerinden önce Qubit florometre yöntemi ile ölçülmüştür. Seçilen dilüsyon serisi kapsamında elde edilen sonuçlara göre bu tez çalışmasında adenovirusun mutlak kantitasyonuna yönelik geliştirilen dPCR yönteminin analitik duyarlılığı ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu; testin alt saptama sınırının qPCR'dan 10 kat daha düşük olması nedeniyle de daha hassas bir yöntem olduğu ve adenovirus tanı ve takibinde alternatif bir tanı yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında nanoplate tabanlı bir dPCR sistemi kullanılmış olup, sistemin elverişli üst saptama sınırı 10.000 kopya/µl'dir. Buna bağlı olarak hedef DNA miktarının 10.000 kopya/ µl'den fazla olduğu dilüsyonlar çalışmaya dahil edilmemiş ve en yüksek konsantrasyon $<10^5$ olarak seçildiğinden, yüksek saturasyona bağlı analiz kısıtlılığı gerçekleşmemiştir ve test sonuçları doğrusallığını korumuştur (R^2=0,9944).

Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarda, düşük viral yükü olan CMV hastalarından alınan kan örneklerinde ddPCR ve qPCR karşılaştırması yapılmıştır.[147,148] Elde edilen sonuçlara göre ddPCR ve qPCR'ın düşük kopya sayılarında eş duyarlılıkta veya ddPCR'ın qPCR'a göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Goujun Cao ve arkadaşlarının yaptığı kök hücre terapisi alan hastalarda vektör kopya sayısının ddPCR ile saptanmasına yönelik bir çalışmada Posner-Schlossman sendromu olan hastalarda düşük kopya sayılarında CMV saptama oranının qPCR'a göre 4 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.[164] Yapılan bu tez çalışmasında da yaklaşık 10^2 kopya/ml HAdV DNA içeren dilüsyonun qPCR sonucuna göre CT değeri güven

aralığının altında sonuç verirken, dPCR ile güvenilir aralık içinde mikrolitrede 1 kopyaya kadar HAdV DNA'nın kantite edilebildiği gösterilmiştir. CMV viral yükünün daha yüksek olduğu durumlarda ise dijital PCR platformlarının daha yüksek tekrarlanabilirlikte kantitatif sonuç verdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da kopya sayısının en düşük olduğu (76,34 kopya/ml) dördüncü dilüsyonda tekrarlanabilirlik ve test hassasiyetinin azaldığı belirlenmiştir. Daha yüksek DNA konsantrasyonu içeren dilüsyonlarda test içi ve testler arası sonuçlara bakıldığında (varyasyon katsayısı, standart sapma) yüksek tekrarlanabilirlikte olduğu gözlemlenmiştir.[165,166] Ne var ki, dijital PCR sistemlerinin doğasında olan kısıtlı dinamik aralığı (üst saptama sınırı 10^5 kopya/µl) göz önünde bulundurulduğunda, dinamik aralığı aşan yüksek DNA kopya sayılarında kantitatif veri elde edilemediği de unutulmamalıdır.

Dijital PCR platformları CMV, Epstein-Barr Virus (EBV) gibi latent virusların çalışılması için de elverişli bir tekniktir. Özellikle İnsan İmmun yetmezlik Virusu (HIV) pozitif hastalarda subklinik herpesvirus koinfeksiyonu bir hayli yaygındır.[167,168] Aaron Christensen-Quick ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bu hasta gruplarında total HIV DNA ve CMV DNA'nın ddPCR yöntemiyle kantitatif olarak ölçülebileceği ve düşük viral kopya sayılarının düşük olduğu erken dönemde de antiretroviral tedavi süresince bu hastaların herpesvirus koinfeksiyonları açısından takip edilebilmesine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir.[169]

Dijital PCR sistemleri proviral DNA ve hücre-ilişkili viral RNA analizi gerçekleştirme imkânı da vermektedir. Ayrıca dijital PCR sistemlerinin diğer yöntemlerle kombine kullanımı da testin duyarlılığını oldukça artırabilmektedir. Lada ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada proviral HIV DNA'nın ölçümü için ddPCR ve pulsed-field jel elektroforezi kombine edildiğinde testin duyarlılığının arttığı bildirilmiştir.[170] Bu veriler de dijital PCR sistemleri ile ilgili yeni bakış açıları gelişmesine katkı sağlamaktadır. Strain ve arkadaşları tarafından antiretroviral tedavi altında düşük HIV DNA kopya sayılarının saptanmasında ddPCR'ın qPCR'dan çok daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.[150]

Dijital PCR sistemleri viral hepatitlerin monitörizasyonu ve kantitasyonu için de iyi bir seçenek olmuştur. Yapılan çalışmalarda Hepatit B Virusu (HBV) DNA'sının hassas bir şekilde ddPCR yöntemi ile ölçülebildiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ddPCR ile HBV DNA kantitasyonunda analitik duyarlılık ve kantitasyon limiti sırasıyla 0,8 kopya/10^5 hücre ve 3,8 kopya/10^5 hücre olarak hesaplanırken, qPCR için bu değerler sırasıyla 19,1 kopya/10^5 hücre ve 71,1 kopya/10^5 hücre olarak hesaplanmıştır.[171] Adenovirusun dijital PCR tabalı test

formatının geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da HBV çalışmasından elde edilen sonuçlarla paralel olarak qPCR ile 76,34 kopya/ml HAdV DNA içeren son dilüsyonun CT değeri 43 iken, dijital PCR yöntemi ile kantitasyon limiti 0,9476/kopya/µl olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu CT değeri qPCR yöntemi için güvenilir eşiğin altında kalırken, dijital PCR ile hassas bir şekilde kantite edilebilmiştir.

Dijital PCR yöntemi, aşı çalışmalarında kontaminasyon varlığını takip etmek amacı ile de tercih edilen bir yöntem olmuştur. Dong ve arkadaşları, embriyonlu yumurtada geliştirilen atenüe aşılarda kümes hayvanları adenovirusu (Fowl Adenovirus, FAdV) kontaminasyonunu gözlemlemek amacı ile konvansiyonel PCR, qPCR ve ddPCR ile çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre ddPC'ın qPCR'a göre 10 kat daha hassas ve çapraz reaksiyon açısından kontrol edildiğinde de daha özgül bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Dijital PCR yöntemleri diğer PCR yöntemleriyle kıyaslandığında daha maliyetli olsa da, mutlak kantitatif sonuç verebilme özelliği, yüksek özgüllük, duyarlılık ve tekrarlanabilir olması nedeniyle biyolojik çalışmalarda avantaj sağlamaktadır.[172] Bu tez çalışmasında da elde edilen sonuçlar nanoplate tabanlı dijital PCR sisteminin qPCR yönteminden yaklaşık 10 kat daha hassas bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Çevreden izole edilen örneklerde çeşitli mikroorganizmaların varlığını saptayabilmek, toplum sağlığı ve hastalığın epidemiyolojisini ve surveyansını takip edebilmek amacıyla son derece önemlidir.[173,174] Toplum sağlığını tehdit eden bu gibi durumlarda tanı amacıyla çeşitli PCR tekniklerinden yararlanılmaktadır. Nehir sularında enterik adenovirusların dijital PCR sistemi ile saptanması ve kantitasyonuna yönelik ilk çalışma Kishida ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada mikroakışkan tabanlı dPCR sistemi kullanılmış ve dPCR'ın doğruluğunun ve duyarlılığının diğer PCR yöntemlerine göre çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir ve testin dinamik aralığı 420-2700 kopya/L olarak belirtilmiştir.[173] Sedji ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da yine nehir sularında dijital PCR yöntemi kullanılarak enterik adenovirus ve norovirus taraması yapılmış olup, yöntemin adenovirus ve norovirus tiplerini yüksek özgüllükte hassas bir şekilde saptamaya elverişli olduğu bildirilmiştir.[174] İnsan adenovirusunun dijital PCR yöntemi ile kantitasyonunun yapıldığı bu tez çalışmasında, triplike olarak test edilmiş dilüsyonlarda ortalama en yüksek saptama düzeyi 770,4 kopya/µl; ortalama en düşük saptama düzeyi ise 0,9476 kopya/µl olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, dijital PCR sisteminin yüksek duyarlılıkta kantitatif sonuç verebildiğini göstermektedir.

PCR yöntemlerindeki süregelen problemlerden bir tanesi, dışkı ve balgam gibi yüksek konsantrasyonlu klinik numunelerde meydana gelen PCR inhibisyonudur. Özellikle dışkı örneklerinde bulunan kompleks polisakkaritler, safra tuzları, yağlar ve ürik asit tuzları inhibisyondan sorumludur.[175] Bu maddelerin konsantrasyonu örnekten örneğe, beslenmeye, mikrobiyotaya ve çevresel koşullara göre değişkenlik göstermektedir. PCR inhibisyonunun üstesinden gelmek için matriks birkaç kat sulandırılarak çalışılmaktadır. Bu yaklaşım inhibisyona engel olsa da hedef DNA sayısının da azalmasına ve dolayısı ile testin duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır.[176] Yapılan çalışmalarda dijital PCR sistemlerinin qPCR yöntemine göre inhibitör maddelerden daha az etkilendiği ve buna bağlı olarak dışkı ve balgam gibi klinik numunelerde daha hassas sonuç verdiği bildirilmiştir.[116,177] Dışkı örneklerinden CMV DNA ve HAdV-F saptamaya yönelik multipleks çalışma yapılmış, ddPCR ve qPCR ile elde edilen bulgular karşılaştırılmıştır. Çalışmada qPCR ile inhibisyona uğramış 15 CMV DNA örneği ddPCR ile kantitatif olarak saptanabilmiştir. Bu bulgularla dijital PCR sistemlerinin inhibisyona yatkın klinik numunelerde de güvenilir kantitatif sonuç verebildiği gösterilmiştir.[177] Bu bilgiler doğrultusunda, yapılan bu tez çalışmasının inhibisyona meyilli klinik numunelerdeki sonuçlarını değerlendirebilmek ve farklı matrikslerde de etkisini gözlemleyebilmek amacıyla, laboratuvar içinde geliştirilen ve valide edilen bu yöntemin bir sonraki aşamada farklı matrikslerle ve klinik çalışmalarla da desteklenmesi hedeflenmektedir.

Salgın hastalıklar, epidemiler ve pandemiler tarihten beri insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu durumlarda hastalığın kontrol altına alınabilmesi için hastalığın epidemiyolojisini ve sürveyansını anlamak gereklidir. Ahmed ve arkadaşları 2020 senesinden bu yana pandemiye neden olan SARS-CoV-2 RNA'nın atık sularda tespitine yönelik RT-dPCR hem de RT-qPCR yöntemleriyle çalışmış ve verileri karşılaştırmışlardır. 96 farklı atık suda çalışılmış olup, RT-dPCR yöntemi ile çalışılan numunelerde RT-qPCR yöntemi ile çalışılanlara göre 6-7 kat daha fazla pozitiflik saptanabildiği ve RT-dPCR platformunda SARS-CoV-2 RNA (CDC N1 ve N2 geni) LoD değerinin, RT-qPCR yöntemine kıyasla 2-5 kat daha düşük olduğu bildirilmiştir.[178] Adenovirusun mutlak kantitasyonuna yönelik dPCR tabanlı bir test formatının geliştirilmesine yönelik yapılan bu çalışmada ise, qPCR ile HAdV DNA LoQ değeri teorik olarak 763,4 kopya/ml olarak hesaplanırken, dPCR yönteminde ise 0,9476 kopya/µl olarak belirlenmiştir.

Son yıllarda dijital PCR sistemleri yalnızca virolojide değil, bakteriyolojide de değer kazanmaya başlamıştır. Leth ve arkadaşları tarafından 2022 yılında BOS örneğinden Lyme

hastalığı etkeni olan *Borrelia burgdorferi'*nin tanısı ve mutlak kantitasyonu için dPCR'a dayalı bir tanı formatı geliştirilmiştir. dPCR yönteminde testin verimliliği sinyal oluşturan pozitif damlacıkların ve negatif partisyonların birbirinden kesin bir şekilde ayrılması veya "yağmur" sinyaller oluşturmasıyla tayin edilmektedir. dPCR yönteminin bu avantajından yararlanarak, çalışma için seçilen spesifik primer ve prob dizilerinin en hassas düzeyde saptamaya elverişli olduğu optimum sıcaklıklar denenerek test için optimum ısı profili seçilmiştir. BOS örneğinden izole edilen *B.burgdorferi* DNA'sının qPCR ile CT değeri >38 olarak belirlenen klinik örnekler çalışmaya alınmış ve dPCR alt saptama sınırının 4/15.000 partisyon olduğu bildirilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler BOS'ta *B.burgdorferi*'nin tanımlanması için dPCR'ın oldukça hassas bir yöntem olduğunu gösterse de, rutin tanı için henüz bu sistemin elverişli olmadığı ve sistemin geliştirilmesi gerektiği bildirilmiştir.[179] Bu tez çalışması kapsamında adenovirus DNA'sının dPCR tabanlı mutlak kantitasyonu için geliştirilen test formatında CT değeri >31 olan dilüsyonlar kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan en düşük CT değeri 41 olup, dPCR yönteminde alt saptama sınırı 0,9476 olarak belirlenmiştir. Ancak standart ve klinik numunelerle gerçekleştirilen testler arasında LoQ değerinde farklılıklar olabileceğinden, yöntemin sahada kullanıma uygun hale getirilebilmesi için çalışmamızın klinik numunelerle de valide edilmesi önem arz etmektedir.

Ülkemizde de dijital PCR yöntemine dayalı çalışmalar hız kazanmıştır. Klinik mikrobiyoloji alanında dijital PCR yöntemine dayalı gerçekleştirilen öncü çalışmalardan biri Kayalar ve ark. tarafından 2021 yılında gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada açık havadaki partikül maddelerin SARS-CoV-2 için potansiyel taşıyıcılığındaki rolü araştırılmıştır. Türkiye genelinde 10 farklı şehirden özel filtreler yarrdımı ile partikül örnekleri toplanmış ve bu partiküllerdeki viral RNA yükü hem real-time PCR hem de dijital PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre real-time PCR ile Ct değeri ≥40 olarak belirlenen örneklerin dPCR ile kantitasyonunun yapılabildiği ve SARS-CoV-2 N1 geni için dPCR alt saptama sınırı 10 kopya/μl^{-1} olarak bildirilmiştir. Bulgulara göre dPCR yönteminin yüksek duyarlılıkta, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sağladığı bildirilmiştir.[180] Bizim çalışmamızda HAdV DNA için alt saptama sınırı 0,9746 kopya/µl belirlenmiş ve yapılan çalışmayla benzer sonuçlar vermiştir. Bu tez çalışması da bildiğimiz kadarıyla Türkiye'de adenovirusun kantitasyonu için dijital PCR tabanlı bir sistem geliştirilmesine yönelik yapılmış ilk validasyon çalışması özelliğini taşımaktadır.

Bir laboratuvarda yeni geliştirilen kantitatif bir test için testin duyarlılığının belirlenmesi ve validasyonun gerçekleştirilmesi gereklidir. Bunları belirlemek amacı ile ISO 15189 ve ISO 17025 Tıbbi Laboratuvarların Akreditasyonu gereğince mutlaka test edilmesi gereken kriterler bulunmaktadır. Bu kriterler geliştirilen testin dinamik aralığının, saptama sınırının (LoD), ölçüm limitinin (LoQ) ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesini gerektirmektedir.[120–122]

Geliştirilen testin dinamik aralığını belirlemek için, her biri üç tekrarlı minimum beş logaritmik konsantrasyon aralığında çalışılması önerilmektedir.[121] Bu tez çalışmasında kullanılan dPCR sisteminin çalışma protokolü gereğince dinamik aralığı 10^4-10^0 kopya/µl olarak bildirilmiştir.[109,131] Çalışmamızın çıkış noktası immunsupresif hastalarda, özellikle pediatrik kemik iliği transplant alıcılarında, adenovirusa bağlı reinfeksiyonları hassas bir şekilde erken saptayabilmek ve sonuç olarak erken tedaviye katkı sağlayarak adenovirusa bağlı mortaliteyi azaltmak olduğundan, düşük viral kopya sayılarında testin duyarlılığını belirlemek bizim için öncelikli olmuştur. Adenovirus tanısında mevcutta kullanılmakta olan moleküler tanı yöntemleri 100 kopyaya kadar hassas bir şekilde saptayabilmektedir. Bu nedenle testin dinamik aralığını belirleyebilmek amacıyla yaklaşık 10^3-10^0 kopya/µl HAdV DNA içeren ardışık dört logaritmik dilüsyon ile çalışılması hem teknik açıdan hem de maliyet açısından uygun görülmüştür.

Yeni geliştirilen bir testte yöntemin duyarlılığını belirlemek, saptama sınırını belirlemekten ileri gelmektedir. Saptama sınırı genel olarak amplifiye edilmiş ürünün en az 0,95 (% LoD95) ihtimalle kalitatif olarak saptandığı en düşük hedef DNA konsantrasyonudur. Bu konsantrasyonun belirlenmesi, tek bileşenden oluşan numunelerin dilüsyon serisi oluşturularak belirlenir.[120,121] Bu teorik bilgilere göre geliştirilen saptama sınırını belirleyebilmek amacı ile ardışık 4 logaritmik dilüsyon çalışılmıştır ve tekrarlı olarak çalışılan testin ortalama LoD değeri 0,9746 kopya/µl olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen testin kantitasyon limiti (LoQ), güvenilir bir şekilde ölçülebilen en düşük analit miktarıdır. Bunu belirlemek için düşük konsantrasyon düzeylerinde analit içeren dilüsyon tekrar tekrar çalışılmalıdır. Kantitasyon sınırı, saptama sınırına eşit olabilir ancak daha düşük olamaz.[122,181] Yapılan bu tez çalışmasında LoQ değerini belirleyebilmek amacı ile ardışık 4 logaritmik dilüsyon, üç ayrı oturumda üçer tekrarlı olarak çalışılmıştır. Geliştirilen testin LoQ değeri LoD değeri ile eşit olup, 09746 kopya/µl olarak saptanmıştır.

Yeni geliştirilen bir testin doğruluğunu oluşturan parametreler gerçeklik ve kesinlik iken; kesinliği de tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik ile koraledir. Tekrarlanabilirlik; testin aynı kondisyonlar altında aynı laboratuvarda, aynı ekipmanla, aynı metodun tek bir analist tarafından birkaç kez test edilmesiyle; tekrar üretilebilirlik ise farklı kondisyonlarda, farklı laboratuvarlarda farklı analistler arafından birkaç kez test edilmesiyle ortaya çıkan sonuçların tutarlılığının değerlendirilmesiyle ölçülür.[120,125] Bu tez çalışması İUC moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında, aynı ekipmanla ve aynı analist tarafından gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan dilüsyonlar toplamda her biri 9 kere olmak üzere tekrar edilerek çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar testin yüksek düzeyde tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Ancak testin tekrar üretilebilirliğini belirleyebilmek amacı ile çalışmanın ilerleyen aşamalarında farklı kondisyonlar altında da çalışılması hedeflenmektedir.

Lineer regresyon analizi (R^2), konsantrasyonu bilinen dilüsyonların tekrar edilen testlerinin ortalama kantitatif değerlerinin birbiriyle olan ilişkisini ve varsa ilişkinin gücünü ortaya koymak için kullanılan bir metottur. Elde edilen değerin 1'e yakın olması, değişkenler arası ilişkinin oldukça yüksek olduğunu ifade etmektedir.[122] Bu tez çalışmasında hedef analit konsantrasyonu bilinen dilüsyonlarda çalışılmıştır. Dilüsyonların konsantrasyonu florometre ile ölçüm yaparak belirlenmiş olup, dPCR testi ile elde edilen kantitatif sonuçlar florometre sonuçlarıyla karşılaştırılarak lineer regresyon analizi gerçekleştirilmiştir ve R^2 analizi 0,9944 olarak belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma insan adenovirusunun mutlak kantitasyonu için dPCR tabanlı bir sistem geliştirilmesine yönelik yönteme dair laboratuvar validasyonu gerçekleştirilen ilk çalışma özelliğindedir. Dijital PCR yöntemi diğer PCR yöntemleri ile karşılaştırıldığında mutlak kantitasyona elverişli olması, düşük kopya sayılarında daha hassas ve güvenilir sonuç vermesi ve standart eğriye ihtiyaç bulundurmadan laboratuvarlar ve kullanıcılar arasında farklı sonu elde etme olasılığının düşük olması özellikleri nedeniyle oldukça avantajlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda, özellikle pediatrik kemik iliği transplant alıcıları gibi immunsupresif hastalarda, transplantasyon sonrası viral yük takibi ve mutlak kantitasyon sağlayabilmek açısından dijital PCR yönteminin kolay ve iyi bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz. Bu doğrultuda, insan adenovirus DNA'sının mutlak kantitasyonu için dijital PCR formatına dayalı geliştirilen bu testin sahada rutin kullanıma uygun hale gelebilmesi amacı ile ileriki aşamalarda klinik çalışmalarla da desteklemeyi hedeflemekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ruuskanen Olli, Jordan P. Metcalf, Matti Waris, G. A. (2017). Adenoviruses. Içinde *Clinical Virology, Fourth Edition* (ss. 575–597).

2. Schilham, M. W., Claas, E. C., van Zaane, W., Heemskerk, B., Vossen, J. M., Lankester, A. C., Toes, R. E., Echavarria, M., Kroes, A. C., & van Tol, M. J. (2002). High Levels of Adenovirus DNA in Serum Correlate with Fatal Outcome of Adenovirus Infection in Children after Allogeneic Stem-Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, *35*(5), 526–532. https://doi.org/10.1086/341770

3. Symeonidis, N., Jakubowski, A., Pierre-Louis, S., Jaffe, D., Pamer, E., Sepkowitz, K., O'Reilly, R. J., & Papanicolaou, G. A. (2007). Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transplant Infectious Disease*, *9*(2), 108–113. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2006.00184.x

4. Bruno, B., Gooley, T., Hackman, R. C., Davis, C., Corey, L., & Boeckh, M. (2003). Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *9*(5), 341–352. https://doi.org/10.1016/S1083-8791(03)00102-2

5. Lion, T., Baumgartinger, R., Watzinger, F., Matthes-Martin, S., Suda, M., Preuner, S., Futterknecht, B., Lawitschka, A., Peters, C., Pötschger, U., & Gadner, H. (2003). Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood*, *102*(3), 1114–1120. https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2152

6. Kosulin, K., Geiger, E., Vécsei, A., Huber, W.-D., Rauch, M., Brenner, E., Wrba, F., Hammer, K., Innerhofer, A., Pötschger, U., Lawitschka, A., Matthes-Leodolter, S., Fritsch, G., & Lion, T. (2016). Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(4), 381.e1-381.e8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.013

7. Lion, T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(3), 441–462. https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13

8. Robin, M., Marque-Juillet, S., Scieux, C., de Latour, R. P., Ferry, C., Rocha, V., Molina, J.-M., Bergeron, A., Devergie, A., Gluckman, E., Ribaud, P., & Socie, G. (2007). Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica*, *92*(9), 1254–1257. https://doi.org/10.3324/haematol.11279

9. Echavarría, M. (2008). Adenoviruses in Immunocompromised Hosts. *Clinical Microbiology Reviews*, *21*(4), 704–715. https://doi.org/10.1128/CMR.00052-07

10. Runde, V., Ross, S., Trenschel, R., Lagemann, E., Basu, O., Renzing-Köhler, K., Schaefer, U., Roggendorf, M., & Holler, E. (2001). Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplantation*, *28*(1), 51–57. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703083

11. Humar, A., Kumar, D., Mazzulli, T., Razonable, R. R., Moussa, G., Paya, C. V., Covington, E., Alecock, E., & Pescovitz, M. D. (2005). A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01033.x

12. Salles, M. J. C., dos Santos Sens, Y. A., Boas, L. V., & Machado, C. M. (2008). Respiratory Viral Infections in Renal Transplant Recipients. *International Journal of Infectious Diseases*, *12*, S15. https://doi.org/10.1016/S1201-9712(08)60035-1

13. Ison, M. G., & Hayden, F. G. (2002). Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Current Opinion in Infectious Diseases*, *15*(4), 355–367. https://doi.org/10.1097/00001432-200208000-00002

14. Zheng, Y., Stamminger, T., & Hearing, P. (2016). E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote Persistent Viral Infection. *PLOS Pathogens*, *12*(1), e1005415. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005415

15. Arya, S. K., Wong-Staal, F., & Gallo, R. C. (1984). Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.

16. Flammer, J. R., Dobrovolna, J., Kennedy, M. A., Chinenov, Y., Glass, C. K., Ivashkiv, L. B., & Rogatsky, I. (2010). The Type I Interferon Signaling Pathway Is a Target for Glucocorticoid Inhibition. *Molecular and Cellular Biology*. https://doi.org/10.1128/mcb.00146-10

17. Hu, X., Li, W.-P., Meng, C., & Ivashkiv, L. B. (2003). Inhibition of IFN-γ Signaling by Glucocorticoids. *The Journal of Immunology*. https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4833

18. González-Vicent, M., Verna, M., Pochon, C., Chandak, A., Vainorius, E., Brundage, T., Mozaffari, E., Nichols, G., & Rao, K. (2019). Current practices in the management of adenovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients in Europe: The AdVance study. *European Journal of Haematology*, *102*(3), 210–217. https://doi.org/10.1111/ejh.13194

19. Lindemans, C. A., Leen, A. M., & Boelens, J. J. (2010). How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*, *116*(25), 5476–5485. https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-259291

20. Ganzenmueller, T., & Heim, A. (2012). Adenoviral load diagnostics by quantitative polymerase chain reaction: techniques and application. *Reviews in Medical Virology*, *22*(3), 194–208. https://doi.org/10.1002/rmv.724

21. Cao, L., Cui, X., Hu, J., Li, Z., Choi, J. R., Yang, Q., Lin, M., Ying Hui, L., & Xu, F. (2017). Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, *90*, 459–474. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.082

22. MILES, J. A. R., PARRY, H. B., LARIN, N. M., & PLATT, H. (1951). Cultivation of Canine Hepatitis Virus in Embryonated Hen's Eggs and its Subsequent Transmission to Dogs. *Nature*, *168*(4277), 699–700. https://doi.org/10.1038/168699a0

23. Larin, N. M. (1951). Studies on the agent of canine virus hepatitis (Rubarth's disease) I. Complement-fixation and precipitin tests. *Journal of Hygiene*. https://doi.org/10.1017/S0022172400066729

24. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., & Ward, T. G. (1953). Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Experimental Biology and Medicine*, *84*(3), 570–573. https://doi.org/10.3181/00379727-84-20714

25. Ward, T. G., Huebner, R. J., Rowe, W. P., Ryan, R. W., & Bell, J. A. (1955). Production of Pharyngoconjunctival Fever in Human Volunteers Inoculated with APC Viruses. *Science*, *122*(3179), 1086–1087. https://doi.org/10.1126/science.122.3179.1086

26. Hilleman, M. R., Stallones, R. A., Gauld, R. L., Wairfield, M. S., & Anderson, S. A. (1956). Prevention of Acute Respiratory Illness in Recruits by Adenovirus (RI-APC-ARD) Vaccine. *Experimental Biology and Medicine*, *92*(2), 377–383. https://doi.org/10.3181/00379727-92-22484

27. Ustaçelebi, Ş. (2008). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Içinde A. T. Wilke, G. Söyletir, & M. Doğanay (Ed.), *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (3rd baskı, ss. 1696–1700). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.

28. *Double Strand DNA Viruses*. (y.y.). Swiss Institute of Bioinformatics. Tarihinde 21 Şubat 2020, adresinden erişildi https://viralzone.expasy.org/236

29. Ruuskanen, O., Metcalf, J. P., Waris, & Akusjärvi, G. (2017). Clinical Virology, Fourth Edition. Içinde H. F. Richman D, Whitley R (Ed.), *Clinical Virology, Fourth Edition* (Fourth edi, ss. 575–597). ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555819439.ch27

30. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). Adenoviruses. Içinde P. M. A. Murray Patrick R., Roshental Ken S. (Ed.), *Medical Microbiology* (8th editio, ss. 418–424). Elsevier Inc.

31. Butel, J. S. (2013). Adenoviruses. Içinde G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse, & T. A. Mietzner (Ed.), *Jawetz,Melnick & Adelberg's Medical Microbiology* (26th baskı, ss. 457–465). The McGraw-Hill Companies, Inc.

32. Harrach, B., & Benkő, M. (2021). Adenoviruses (Adenoviridae). Içinde D. Bamford & M. Zuckerman (Ed.), *Encyclopedia of Virology* (4th baskı, ss. 3–16). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00057-6

33. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). Medical Microbiology 8th edition. Içinde P. M. A. Murray Patrick R., Roshental Ken S. (Ed.), *Medical Microbiology* (8th editio, ss. 418–424). Elsevier Inc.

34. Kajon, A. E., Weinberg, J. B., & Spindler, K. R. (2019). Adenoviruses. *Reference Module in Biomedical Sciences*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00086-6

35. Nilsson, E. C., Storm, R. J., Bauer, J., Johansson, S. M. C., Lookene, A., Ångström, J., Hedenström, M., Eriksson, T. L., FräCurrency Signngsmyr, L., Rinaldi, S., Willison, H. J., Domellöf, F. P., Stehle, T., & Arnberg, N. (2011). The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nature Medicine*, *17*(1), 105–109. https://doi.org/10.1038/nm.2267

36. Trinh, H. V., Lesage, G., Chennamparampil, V., Vollenweider, B., Burckhardt, C. J., Schauer, S., Havenga, M., Greber, U. F., & Hemmi, S. (2012). Avidity Binding of Human Adenovirus Serotypes 3 and 7 to the Membrane Cofactor CD46 Triggers Infection. *Journal of Virology*, *86*(3), 1623–1637. https://doi.org/10.1128/jvi.06181-11

37. Wang, H., Li, Z. Y., Liu, Y., Persson, J., Beyer, I., Möller, T., Koyuncu, D., Drescher, M. R., Strauss, R., Zhang, X. B., Wahl, J. K., Urban, N., Drescher, C., Hemminki, A., Fender, P., & Lieber, A. (2011). Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nature Medicine*, *17*(1), 96–104. https://doi.org/10.1038/nm.2270

38. Robinson, C., & Echavarria, M. (2007). Adenoviruses. Içinde P. R. Murray, E. Baron, J. Jorgen, M. Landry, & M. A. Pfaller (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (ss. 1589–1600). ASM Press.

39. Wold, W., & Horwitz, M. S. (2006). Adenoviruses. Içinde D. Knipe & P. Howley (Ed.), *Fields Virology* (5. baskı, ss. 2396–2437). Lippincott Wiliams & Wilkins.

40. Smith, J. G., Wiethoff, C. M., Stewart, P. L., & Nemerow, G. R. (2010). Adenovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *343*(1), 195–224.

https://doi.org/10.1007/82-2010-16

41. Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L., & Nemerow, G. R. (2005). Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *Journal of Virology*, *79*(4), 1992–2000. https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.1992-2000.2005

42. Robinson, C. M., Seto, D., Jones, M. S., Dyer, D. W., & Chodosh, J. (2011). Molecular evolution of human species D adenoviruses. Içinde *Infection, Genetics and Evolution* (C. 11, Sayı 6, ss. 1208–1217). https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.031

43. King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2011). Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Içinde A. King, M. Adams, E. Carstens, & E. Lefkowitz (Ed.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc.

44. Ağaçfidan, A. (2005). Adenoviridae, Reoviridae, Coronaviridae. Içinde E. Bozkaya (Ed.), *Tıbbi Mikrobiyoloji* (1. baskı, ss. 239–242). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.

45. Valentine, R. C., & Pereira, H. G. (1965). Antigens and structure of the adenovirus. *Journal of Molecular Biology*, *13*(1), 13-IN13. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80076-6

46. Waye, M. M. Y., & Sing, C. W. (2010). Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals*, *3*(10), 3343–3354. https://doi.org/10.3390/ph3103343

47. Challberg, M. D., & Kelly, T. J. (1989). Animal virus DNA replication. Içinde *Annual Review of Biochemistry*. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.58.1.671

48. Hay, R. T., & Russell, W. C. (1989). Recognition mechanisms in the synthesis of animal virus DNA. Içinde *Biochemical Journal* (C. 258, Sayı 1, ss. 3–16). https://doi.org/10.1042/bj2580003

49. Hoeben, R. C., & Uil, T. G. (2013). Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(3), a013003–a013003. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013003

50. Charman, M., Herrmann, C., & Weitzman, M. D. (2019). Viral and cellular interactions

during adenovirus DNA replication. Içinde *FEBS Letters* (C. 593, Sayı 24, ss. 3531–3550). https://doi.org/10.1002/1873-3468.13695

51. Harrach, B. (2014). Adenoviruses: General Features☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02523-X

52. Şener, K., & Kubar, A. (2017). Adenoviruslar. Içinde A. Willke Topçu, G. Söyletir, & M. Doğanay (Ed.), *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (4. baskı, ss. 1504–1509). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.

53. Leppard, K. N. (2008). Adenoviruses: Molecular Biology. Içinde *Encyclopedia of Virology* (ss. 17–23). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00356-3

54. Lichy, J. H., Field, J., Horwitz, M. S., & Hurwitz, J. (1982). Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: Role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. https://doi.org/10.1073/pnas.79.17.5225

55. Echavarria, M. (2009). Adenoviruses. Içinde A. Zuckerman, J. Banatvala, B. Schoub, P. Griffiths, & P. Mortimer (Ed.), *Priciples and Practice of Clinical Virology* (6. baskı, ss. 463–488). Wiley-Blackwell.

56. Stephan, G. (2005). Adenovirus. Içinde G. Mandell, J. Bennett, & R. Dolin (Ed.), *Priciples and Practice of Infectious Diseases* (6. baskı, ss. 1835–1841). Livingstone Inc.

57. Gray, G. C., Goswami, P. R., Malasig, M. D., Hawksworth, A. W., Trump, D. H., Ryan, M. A., & Schnurr, D. P. (2000). Adult adenovirus infections: Loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. *Clinical Infectious Diseases*, *31*(3), 663–670. https://doi.org/10.1086/313999

58. Turner, M., Istre, G. R., Beauchamp, H., Baum, M., & Arnold, S. (1987). Community outbreak of adenovirus type 7a infections associated with a swimming pool. *Southern Medical Journal*, *80*(6), 712–715. https://doi.org/10.1097/00007611-198706000-00012

59. Kajon, A. E., Mistchenko, A. S., Videla, C., Hortal, M., Wadell, G., & Avendaño, L. F. (1996). Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the South Cone of South America (1991-1994). *Journal of Medical Virology*,

48(2), 151–156. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199602)48:2<151::AID-JMV6>3.0.CO;2-8

60. Gönüllü, N. (2011). Adenovirus, Papovavirus ve Parvoviruslar. Içinde N. Kiraz, M. Samastı, & G. Aygün (Ed.), *Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji* (ss. 1147–1153). İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi.

61. Bartolom, J., Lpez-Alcorocho, J. M., Ortiz-Movilla, N., Manzarbeitia, F., Pardo, M., & Carreo, V. (2001). Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. *Journal of Medical Virology*, *64*(2), 167–174. https://doi.org/10.1002/jmv.1032

62. Kolavic-Gray, S. A., Binn, L. N., Sanchez, J. L., Cersovsky, S. B., Polyak, C. S., Mitchell-Raymundo, F., Asher, L. V., Vaughn, D. W., Feighner, B. H., & Innis, B. L. (2002). Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: Epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Clinical Infectious Diseases*, *35*(7), 808–818. https://doi.org/10.1086/342573

63. Echavarria, M., Sanchez, J. L., Kolavic-Gray, S. A., Polyak, C. S., Mitchell-Raymundo, F., Innis, B. L., Vaughn, D., Reynolds, R., & Binn, L. N. (2003). Rapid detection of adenovirus in throat swab specimens by PCR during respiratory disease outbreaks among military recruits. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(2), 810–812. https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.810-812.2003

64. Echavarria, M. S., Ray, S. C., Ambinder, R., Dumler, J. S., & Charache, P. (1999). PCR Detection of Adenovirus in a Bone Marrow Transplant Recipient: Hemorrhagic Cystitis as a Presenting Manifestation of Disseminated Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(3), 686–689. https://doi.org/10.1128/JCM.37.3.686-689.1999

65. Hierholzer, J. C. (1992). Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clinical Microbiology Reviews*, *5*(3), 262–274. https://doi.org/10.1128/CMR.5.3.262

66. Yusuf, U., Hale, G. A., Carr, J., Gu, Z., Benaim, E., Woodard, P., Kasow, K. A., Horwitz, E. M., Leung, W., Srivastava, D. K., Handgretinger, R., & Hayden, R. T. (2006). Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation*, *81*(10), 1398–1404.

https://doi.org/10.1097/01.tp.0000209195.95115.8e

67. Dhurandhar, N. V, Whigham, L. D., Abbott, D. H., Schultz-Darken, N. J., Israel, B. A., Bradley, S. M., Kemnitz, J. W., Allison, D. B., & Atkinson, R. L. (2002). Human adenovirus Ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys. *Journal of Nutrition*, *132*(10), 3155–3160. https://doi.org/10.1093/jn/131.10.3155

68. Dinç, H. Ö., & Kocazeybek, B. S. (2015). *Obez Çocuklarda Adenovirus Tip-36 Seropozitifliği ve Adipokin Düzeyleri*. Istanbul University Faculty of Medicine.

69. Matthes-Martin, S., Feuchtinger, T., Shaw, P. J., Engelhard, D., Hirsch, H. H., Cordonnier, C., & Ljungman, P. (2012). European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transplant Infectious Disease*, *14*(6), 555–563. https://doi.org/10.1111/tid.12022

70. Van Doornum, G. J. J., & De Jong, J. C. (1998). Rapid shell vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: Comparison with conventional virus isolation method. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(10), 2865–2868. https://doi.org/10.1128/jcm.36.10.2865-2868.1998

71. Arı, Ş. (2018). DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Içinde G. Temizkan & N. Arda (Ed.), *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri-Genomik ve Proteomik Analizler* (ss. 291–312). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.

72. Waters, D. L. E., & Shapter, F. M. (2014). *Chapter 7 The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods*. *1099*(1), 65–75. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0

73. GenScript. (2020). PCR protocol, PCR steps. *GenScript*, *2020*, 1–3. https://www.genscript.com/pcr-protocol-pcr-steps.html

74. Harrach, B., & Benkő, M. (2021). Adenoviruses (Adenoviridae). Içinde *Encyclopedia of Virology* (4th edidio, C. 2, ss. 3–16). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00057-6

75. Hiwarkar, P., Kosulin, K., Cesaro, S., Mikulska, M., Styczynski, J., Wynn, R., & Lion, T. (2018). Management of adenovirus infection in patients after haematopoietic stem cell transplantation: State-of-the-art and real-life current approach. *Reviews in Medical*

Virology, *28*(3), e1980. https://doi.org/10.1002/rmv.1980

76. Savón, C., Acosta, B., Valdés, O., Goyenechea, A., Gonzalez, G., Piñón, A., Más, P., Rosario, D., Capó, V., Kourí, V., Martínez, P. A., Marchena, J. J., González, G., Rodriguez, H., & Guzmán, M. G. (2008). A myocarditis outbreak with fatal cases associated with adenovirus subgenera C among children from Havana City in 2005. *Journal of Clinical Virology*, *43*(2), 152–157. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.05.012

77. Cesaro, S., Berger, M., Tridello, G., Mikulska, M., Ward, K. N., Ljungman, P., Van Der Werf, S., Averbuch, D., & Styczynski, J. (2019). A survey on incidence and management of adenovirus infection after allogeneic HSCT. *Bone Marrow Transplantation*, *54*(8), 1275–1280. https://doi.org/10.1038/s41409-018-0421-0

78. Bhumbra, N., & Wroblewski, M. E. (2010). In brief: Adenovirus. Içinde *Pediatrics in Review* (C. 31, Sayı 4, ss. 173–174). https://doi.org/10.1542/pir.31-4-173

79. Ghebremedhin, B. (2014). Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *4*(1), 26–33. https://doi.org/10.1556/eujmi.4.2014.1.2

80. Ison, M. G., & Hayden, R. T. (2016). Adenovirus. Içinde R. T. Hayden, D. M. Wolk, K. C. Carroll, & Y.-W. Tang (Ed.), *Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host* (C. 4, Sayı 4, ss. 217–232). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0020-2015

81. Fox, J. P., Brandt, C. D., Wassermann, F. E., Hall, C. E., Spigland, I., Kogon, A., & Elveback, L. R. (1969). The virus watch program: A continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families: Observations of adenovirus infections: Virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infection, and relation t. *American Journal of Epidemiology*, *89*(1), 25–50. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120913

82. HALL, C. E., COONEY, M. K., & FOX, J. P. (1973). the Seattle Virus Watch. *American Journal of Epidemiology*, *98*(5), 365–380. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121566

83. Garnett, C. T., Erdman, D., Xu, W., & Gooding, L. R. (2002). Prevalence and Quantitation of Species C Adenovirus DNA in Human Mucosal Lymphocytes. *Journal of Virology*, *76*(21), 10608–10616. https://doi.org/10.1128/jvi.76.21.10608-10616.2002

84. Roy, S., Calcedo, R., Medina-Jaszek, A., Keough, M., Peng, H., & Wilson, J. M. (2011). Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract. *PLoS ONE*, *6*(9), e24859. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024859

85. Binder, A. M., Biggs, H. M., Haynes, A. K., Chommanard, C., Lu, X., Dean, ;, Erdman, D., Watson, J. T., & Gerber, S. I. (2017). Morbidity and Mortality Weekly Report Human Adenovirus Surveillance-United States, 2003-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, *66*(39), 1039–1042.

86. Ho, V. T., & Soiffer, R. J. (2001). The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Içinde *Blood* (C. 98, Sayı 12, ss. 3192–3204). https://doi.org/10.1182/blood.V98.12.3192

87. Van Tol, M. J. D., Claas, E. C. J., Heemskerk, B., Veltrop-Duits, L. A., de Brouwer, C. S., van Vreeswijk, T., Sombroek, C. C., Kroes, A. C. M., Beersma, M. F. C., De Klerk, E. P. A., Egeler, R. M., Lankester, A. C., & Schilham, M. W. (2005). Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: Diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplantation*, *35*(S1), S73–S76. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704852

88. Zaia, J., Baden, L., Boeckh, M. J., Chakrabarti, S., Einsele, H., Ljungman, P., McDonald, G. B., & Hirsch, H. (2009). Viral disease prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *44*(8), 471–482. https://doi.org/10.1038/bmt.2009.258

89. Tomblyn, M., Chiller, T., Einsele, H., Gress, R., Sepkowitz, K., Storek, J., Wingard, J. R., Young, J.-A. A. H., & Boeckh, M. J. (2009). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: A global perspective. Içinde *Bone Marrow Transplantation* (C. 44, Sayı 8, ss. 453–455). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/bmt.2009.254

90. Radke, J. R., & Cook, J. L. (2018). Human adenovirus infections: Update and consideration of mechanisms of viral persistence. Içinde *Current Opinion in Infectious*

Diseases (C. 31, Sayı 3, ss. 251–256). https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000451

91. De Mezerville, M. H., Tellier, R., Richardson, S., Hébert, D., Doyle, J., & Allen, U. (2006). Adenoviral infections in pediatric transplant recipients: A hospital-based study. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *25*(9), 815–818. https://doi.org/10.1097/01.inf.0000233542.48267.fd

92. Lion, T., Kosulin, K., Landlinger, C., Rauch, M., Preuner, S., Jugovic, D., Pötschger, U., Lawitschka, A., Peters, C., Fritsch, G., & Matthes-Martin, S. (2010). Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, *24*(4), 706–714. https://doi.org/10.1038/leu.2010.4

93. Kosulin, K., Berkowitsch, B., Matthes, S., Pichler, H., Lawitschka, A., Pötschger, U., Fritsch, G., & Lion, T. (2018). Intestinal Adenovirus Shedding Before Allogeneic Stem Cell Transplantation Is a Risk Factor for Invasive Infection Post-transplant. *EBioMedicine*, *28*, 114–119. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.12.030

94. Ison, M. G. (2006). Emerging Infections: Adenovirus Infections in Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, *43*(3), 331–339. https://doi.org/10.1086/505498

95. Baldwin, A., Kingman, H., Darville, M., Foot, A., Grier, D., Cornish, J., Goulden, N., Oakhill, A., Pamphilon, D., Steward, C., & Marks, D. (2000). Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *26*(12), 1333–1338. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702716

96. Luján-Zilbermann, J., & Berman, D. M. (2018). Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. Içinde *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (ss. 573-578.e2). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00096-7

97. César Pereira Santos, H., Nunes Vieira Almeida, T., Souza Fiaccadori, F., das Dôres de Paula Cardoso, D., de Moraes Arantes, A., Delleon da Silva, H., Resende Alo Nagib, P., & Souza, M. (2017). Adenovirus infection among allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of Medical Virology*, *89*(2), 298–303. https://doi.org/10.1002/jmv.24579

98. Anderson, E. J., Guzman-Cottrill, J. A., Kletzel, M., Thormann, K., Sullivan, C., Zheng, X., & Katz, B. Z. (2008). High-risk adenovirus-infected pediatric allogeneic hematopoietic progenitor cell transplant recipients and preemptive cidofovir therapy. *Pediatric Transplantation*, *12*(2), 219–227. https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2007.00851.x

99. Bhadri, V. A., Lee-Horn, L., & Shaw, P. J. (2009). Safety and tolerability of cidofovir in high-risk pediatric patients: Short communication. *Transplant Infectious Disease*, *11*(4), 373–379. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2009.00391.x

100. Ljungman, P., Ribaud, P., Eyrich, M., Matthes-Martin, S., Einsele, H., Bleakley, M., Machaczka, M., Bierings, M., Bosi, A., Gratecos, N., & Cordonnier, C. (2003). Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *31*(6), 481–486. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703798

101. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, *230*(4732), 1350–1354. https://doi.org/10.1126/science.2999980

102. Simmonds, P., Balfe, P., Peutherer, J. F., Ludlam, C. A., Bishop, J. O., & Brown, A. J. (1990). Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *Journal of Virology*, *64*(2), 864–872. https://doi.org/10.1128/jvi.64.2.864-872.1990

103. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1987). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, *239*(29), 487–491.

104. Whale, A. S., De Spiegelaere, W., Trypsteen, W., Nour, A. A., Bae, Y.-K., Benes, V., Burke, D., Cleveland, M., Corbisier, P., Devonshire, A. S., Dong, L., Drandi, D., Foy, C. A., Garson, J. A., He, H.-J., Hellemans, J., Kubista, M., Lievens, A., Makrigiorgos, M. G., … Huggett, J. F. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum

Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical Chemistry*, *66*(8), 1012–1029. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125

105. Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, *56*(2), 341–361. https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90469-4

106. Bartlett, J., & Stirling, D. (2003). No Title. Içinde J. Bartlett & D. Stirling (Ed.), *PCR Protocols* (ss. 3–6). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0055-0_1

107. Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73

108. Tellinghuisen, J., & Spiess, A.-N. (2015). Absolute Copy Number from the Statistics of the Quantification Cycle in Replicate Quantitative Polymerase Chain Reaction Experiments. *Analytical Chemistry*, *87*(3), 1889–1895. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00077

109. Gmbh, Q., & Strasse, Q. (2020). *QIAcuity User Manual*. https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5d19083d-fa10-4ed2-88a0-2953d9947e0c&lang=en

110. Li, H., Pan, J., & Fang, Q. (2020). Development and Application of Digital PCR Technology. *Progress in Chemistry*, *32*(5), 581–593. https://doi.org/10.7536/PC190913

111. Dube, S., Qin, J., & Ramakrishnan, R. (2008). Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLoS ONE*, *3*(8), e2876. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002876

112. Brown, L. D., Cai, T. T., & DasGupta, A. (2001). Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Statistical Science*, *16*(2). https://doi.org/10.1214/ss/1009213286

113. Jacobs, B. K. M., Goetghebeur, E., & Clement, L. (2014). Impact of variance components on reliability of absolute quantification using digital PCR. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 283. https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-283

114. Kojabad, A. A., Farzanehpour, M., Galeh, H. E. G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., & Nodooshan, M. M. (2021). Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *Journal of Medical Virology*, *93*(7), 4182–4197. https://doi.org/10.1002/jmv.26846

115. Sanders, R., Mason, D. J., Foy, C. A., & Huggett, J. F. (2013). Evaluation of Digital PCR for Absolute RNA Quantification. *PLoS ONE*, *8*(9), e75296. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075296

116. Arvia, R., Sollai, M., Pierucci, F., Urso, C., Massi, D., & Zakrzewska, K. (2017). Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *Journal of Virological Methods*, *246*(April), 15–20. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.003

117. Tawfik, D. S., & Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*, *16*(7), 652–656. https://doi.org/10.1038/nbt0798-652

118. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., … Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, *437*(7057), 376–380. https://doi.org/10.1038/nature03959

119. *What is dPCR?* (y.y.). Tarihinde 20 Kasım 2022, adresinden erişildi https://www.bioxpedia.com/qiacuity-system/

120. Rabenau, H. F., Kessler, H. H., Kortenbusch, M., Steinhorst, A., Raggam, R. B., & Berger, A. (2007). Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *Journal of Clinical Virology*, *40*(2), 93–98. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.07.009

121. Pum, J. (2019). A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. Içinde *Advances in Clinical Chemistry* (1. baskı, C. 90, ss. 215–281). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.01.006

122. Burd, E. M. (2010). Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(3), 550–576. https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09

123. Bartlett, J. W., & Frost, C. (2008). Reliability, repeatability and reproducibility: analysis of measurement errors in continuous variables. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *31*(4), 466–475. https://doi.org/10.1002/uog.5256

124. UK Standards for Microbiology Investigations: Evaluations, validations and verifications of diagnostic tests. (2017). Içinde *Public Health England*.

125. Doganturk, Y. E., Kuskucu, M. A., Hokelek, M., & Bahar-Tokman, H. (2022). Development of Real-Time PCR-Based System that Detects Kinetoplast DNA for Diagnosis of Leishmania Infections. *Cerrahpasa Medical Journal*. https://doi.org/10.54614/cjm.2022.21083

126. Feghoul, L., Chevret, S., Cuinet, A., Dalle, J.-H., Ouachée, M., Yacouben, K., Fahd, M., Guérin-El Khourouj, V., Roupret-Serzec, J., Sterkers, G., Baruchel, A., Simon, F., & LeGoff, J. (2015). Adenovirus infection and disease in paediatric haematopoietic stem cell transplant patients: clues for antiviral pre-emptive treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*(7), 701–709. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.03.011

127. Mynarek, M., Ganzenmueller, T., Mueller-Heine, A., Mielke, C., Gonnermann, A., Beier, R., Sauer, M., Eiz-Vesper, B., Kohstall, U., Sykora, K.-W., Heim, A., & Maecker-Kolhoff, B. (2014). Patient, Virus, and Treatment-Related Risk Factors in Pediatric Adenovirus Infection after Stem Cell Transplantation: Results of a Routine Monitoring Program. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *20*(2), 250–256. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.11.009

128. WY Ip, W., & Qasim, W. (2013). Management of Adenovirus in Children after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Advances in Hematology*, *2013*(Table 1), 1–12. https://doi.org/10.1155/2013/176418

129. Yadana, S., Coleman, K. K., Nguyen, T. T., Hansen-Estruch, C., Kalimuddin, S., Thoon, K. C., Low, J. G. H., & Gray, G. C. (2019). Monitoring for Airborne Respiratory Viruses in a General Pediatric Ward in Singapore. *Journal of Public Health Research*, *8*(3),

jphr.2019.1407. https://doi.org/10.4081/jphr.2019.1407

130. Tibbetts, R. J. (2015). Verification and Validation of Tests Used in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, *37*(19), 153–160. https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.09.004

131. Qiagen. (2022). *Application Note: Transferring and optimizing assays from quantitative PCR to digital PCR on the QIAcuity® system*.

132. Shields, A. F., Hackman, R. C., Fife, K. H., Corey, L., & Meyers, J. D. (1985). Adenovirus Infections in Patients Undergoing Bone-Marrow Transplantation. *New England Journal of Medicine*, *312*(9), 529–533. https://doi.org/10.1056/NEJM198502283120901

133. Claas, E. C. J., Schilham, M. W., de Brouwer, C. S., Hubacek, P., Echavarria, M., Lankester, A. C., van Tol, M. J. D., & Kroes, A. C. M. (2005). Internally Controlled Real-Time PCR Monitoring of Adenovirus DNA Load in Serum or Plasma of Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(4), 1738–1744. https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1738-1744.2005

134. Blanke, C., Clark, C., Broun, R., Tricot, G., Cunningham, I., Cornetta, K., Hedderman, A., & Hromas, R. (1995). Evolving pathogens in allogeneic bone marrow transplantation: Increased fatal adenoviral infections. *The American Journal of Medicine*, *99*(3), 326–328. https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)80169-7

135. Carrigan, PhD, D. R. (1997). Adenovirus Infections in Immunocompromised Patients. *The American Journal of Medicine*, *102*(3), 71–74. https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00015-6

136. Childs, R., Sanchez, C., Engler, H., Preuss, J., Rosenfeld, S., Dunbar, C., van Rhee, F., Plante, M., Phang, S., & Barrett, A. (1998). High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplantation*, *22*(9), 889–893. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701440

137. Flomenberg, P., Babbitt, J., Drobyski, W. R., Ash, R. C., Carrigan, D. R., Sedmak, G.

V., McAuliffe, T., Camitta, B., Horowitz, M. M., Bunin, N., & Casper, J. T. (1994). Increasing Incidence of Adenovirus Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, *169*(4), 775–781. https://doi.org/10.1093/infdis/169.4.775

138. Hale, G., Heslop, H., Krance, R., Brenner, M., Jayawardene, D., Srivastava, D., & Patrick, C. (1999). Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *23*(3), 277–282. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701563

139. Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P., & Horwitz, M. S. (2003). The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Reviews in Medical Virology*, *13*(3), 155–171. https://doi.org/10.1002/rmv.386

140. Hiwarkar, P., Kosulin, K., Cesaro, S., Mikulska, M., Styczynski, J., Wynn, R., & Lion, T. (2018). Management of adenovirus infection in patients after haematopoietic stem cell transplantation: State-of-the-art and real-life current approach. *Reviews in Medical Virology*, *28*(3), e1980. https://doi.org/10.1002/rmv.1980

141. Tomblyn, M., Chiller, T., Einsele, H., Gress, R., Sepkowitz, K., Storek, J., Wingard, J. R., Young, J.-A. H., & Boeckh, M. A. (2009). Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *15*(10), 1143–1238. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.06.019

142. Zaia, J., Baden, L., Boeckh, M. J., Chakrabarti, S., Einsele, H., Ljungman, P., McDonald, G. B., & Hirsch, H. (2009). Viral disease prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *44*(8), 471–482. https://doi.org/10.1038/bmt.2009.258

143. Matthes-Martin, S., Feuchtinger, T., Shaw, P. J., Engelhard, D., Hirsch, H. H., Cordonnier, C., & Ljungman, P. (2012). European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transplant Infectious Disease*, *14*(6), 555–563. https://doi.org/10.1111/tid.12022

144. Anderson, E. J., Guzman-Cottrill, J. A., Kletzel, M., Thormann, K., Sullivan, C., Zheng, X., & Katz, B. Z. (2008). High-risk adenovirus-infected pediatric allogeneic

hematopoietic progenitor cell transplant recipients and preemptive cidofovir therapy. *Pediatric Transplantation*, *12*(2), 219–227. https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2007.00851.x

145. Yusuf, U., Hale, G. A., Carr, J., Gu, Z., Benaim, E., Woodard, P., Kasow, K. A., Horwitz, E. M., Leung, W., Srivastava, D. K., Handgretinger, R., & Hayden, R. T. (2006). Cidofovir for the Treatment of Adenoviral Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients. *Transplantation*, *81*(10), 1398–1404. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000209195.95115.8e

146. Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, *18*(4), 1271. https://doi.org/10.3390/s18041271

147. Taylor, S. C., Carbonneau, J., Shelton, D. N., & Boivin, G. (2015). Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *Journal of Virological Methods*, *224*, 58–66. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.014

148. Ahn, S. M., Chan, J. Y. K., Zhang, Z., Wang, H., Khan, Z., Bishop, J. A., Westra, W., Koch, W. M., & Califano, J. A. (2014). Saliva and Plasma Quantitative Polymerase Chain Reaction–Based Detection and Surveillance of Human Papillomavirus–Related Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, *140*(9), 846. https://doi.org/10.1001/jamaoto.2014.1338

149. Morgan, R. A., Unti, M. J., Aleshe, B., Brown, D., Osborne, K. S., Koziol, C., Ayoub, P. G., Smith, O. B., O'Brien, R., Tam, C., Miyahira, E., Ruiz, M., Quintos, J. P., Senadheera, S., Hollis, R. P., & Kohn, D. B. (2020). Improved Titer and Gene Transfer by Lentiviral Vectors Using Novel, Small β-Globin Locus Control Region Elements. *Molecular Therapy*, *28*(1), 328–340. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.020

150. Strain, M. C., Lada, S. M., Luong, T., Rought, S. E., Gianella, S., Terry, V. H., Spina, C. A., Woelk, C. H., & Richman, D. D. (2013). Highly Precise Measurement of HIV DNA by Droplet Digital PCR. *PLoS ONE*, *8*(4), e55943. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055943

151. van den Berg, F. T., Makoah, N. A., Ali, S. A., Scott, T. A., Mapengo, R. E.,

Mutsvunguma, L. Z., Mkhize, N. N., Lambson, B. E., Kgagudi, P. D., Crowther, C., Abdool Karim, S. S., Balazs, A. B., Weinberg, M. S., Ely, A., Arbuthnot, P. B., & Morris, L. (2019). AAV-Mediated Expression of Broadly Neutralizing and Vaccine-like Antibodies Targeting the HIV-1 Envelope V2 Region. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *14*, 100–112. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.06.002

152. Anderson, E. M., Simonetti, F. R., Gorelick, R. J., Hill, S., Gouzoulis, M. A., Bell, J., Rehm, C., Pérez, L., Boritz, E., Wu, X., Wells, D., Hughes, S. H., Rao, V., Coffin, J. M., Kearney, M. F., & Maldarelli, F. (2020). Dynamic Shifts in the HIV Proviral Landscape During Long Term Combination Antiretroviral Therapy: Implications for Persistence and Control of HIV Infections. *Viruses*, *12*(2), 136. https://doi.org/10.3390/v12020136

153. Sedlak, R. H., Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2014). A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *80*(4), 285–286. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.004

154. Gibellini, L., Pecorini, S., De Biasi, S., Pinti, M., Bianchini, E., De Gaetano, A., Digaetano, M., Pullano, R., Lo Tartaro, D., Iannone, A., Mussini, C., Cossarizza, A., & Nasi, M. (2018). Exploring viral reservoir: The combining approach of cell sorting and droplet digital PCR. *Methods*, *134–135*, 98–105. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.11.014

155. Pasternak, A. O., & Berkhout, B. (2018). What do we measure when we measure cell-associated HIV RNA. *Retrovirology*, *15*(1), 13. https://doi.org/10.1186/s12977-018-0397-2

156. Persson, S., Karlsson, M., Borsch-Reniers, H., Ellström, P., Eriksson, R., & Simonsson, M. (2019). Missing the Match Might Not Cost You the Game: Primer-Template Mismatches Studied in Different Hepatitis A Virus Variants. *Food and Environmental Virology*, *11*(3), 297–308. https://doi.org/10.1007/s12560-019-09387-z

157. Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H. L. A., Papatheodoridis, G., Zoulim, F., & Tacke, F. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, *67*(2), 370–398.

https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021

158. Raimondo, G., Locarnini, S., Pollicino, T., Levrero, M., Zoulim, F., Lok, A. S., Allain, J.-P., Berg, T., Bertoletti, A., Brunetto, M. R., Bruno, R., Chen, D.-S., Coppola, N., Cornberg, M., Craxì, A., Dandri, M., Di Marco, V., Ferrari, C., Gaeta, G. B., … Yuen, M.-F. (2019). Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, *71*(2), 397–408. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034

159. Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., & Bustin, S. A. (2013). The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *59*(6), 892–902. https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375

160. Allied Market Research. (2022). *Digital PCR Market By Technology, By Product Type, By Application, By End User: Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020-2030*.

161. Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, *186*, 20–31. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007

162. Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., & Emslie, K. R. (2012). Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytical Chemistry*, *84*(2), 1003–1011. https://doi.org/10.1021/ac202578x

163. Verhaegen, B., De Reu, K., De Zutter, L., Verstraete, K., Heyndrickx, M., & Van Coillie, E. (2016). Comparison of Droplet Digital PCR and qPCR for the Quantification of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Bovine Feces. *Toxins*, *8*(5), 157. https://doi.org/10.3390/toxins8050157

164. Lin, H.-T., Okumura, T., Yatsuda, Y., Ito, S., Nakauchi, H., & Otsu, M. (2016). Application of Droplet Digital PCR for Estimating Vector Copy Number States in Stem Cell Gene Therapy. *Human Gene Therapy Methods*, *27*(5), 197–208.

https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.059

165. Dyavar, S. R., Ye, Z., Byrareddy, S. N., Scarsi, K. K., Winchester, L. C., Weinhold, J. A., Fletcher, C. V., & Podany, A. T. (2018). Normalization of cell associated antiretroviral drug concentrations with a novel RPP30 droplet digital PCR assay. *Scientific Reports*, *8*(1), 3626. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21882-0

166. Lock, M., Alvira, M. R., Chen, S.-J., & Wilson, J. M. (2014). Absolute Determination of Single-Stranded and Self-Complementary Adeno-Associated Viral Vector Genome Titers by Droplet Digital PCR. *Human Gene Therapy Methods*, *25*(2), 115–125. https://doi.org/10.1089/hgtb.2013.131

167. Bogožalec Košir, A., Cvelbar, T., Kammel, M., Grunert, H.-P., Zeichhardt, H., & Milavec, M. (2020). Digital PCR method for detection and quantification of specific antimicrobial drug-resistance mutations in human cytomegalovirus. *Journal of Virological Methods*, *281*, 113864. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113864

168. Lin, C.-T. M., Leibovitch, E. C., Almira-Suarez, M. I., & Jacobson, S. (2016). Human herpesvirus multiplex ddPCR detection in brain tissue from low- and high-grade astrocytoma cases and controls. *Infectious Agents and Cancer*, *11*(1), 32. https://doi.org/10.1186/s13027-016-0081-x

169. Christensen-Quick, A., Massanella, M., Frick, A., Rawlings, S. A., Spina, C., Vargas-Meneses, M., Schrier, R., Nakazawa, M., Anderson, C., & Gianella, S. (2019). Subclinical Cytomegalovirus DNA Is Associated with CD4 T Cell Activation and Impaired CD8 T Cell CD107a Expression in People Living with HIV despite Early Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, *93*(13). https://doi.org/10.1128/JVI.00179-19

170. Lada, S. M., Huang, K., VanBelzen, D. J., Montaner, L. J., O'Doherty, U., & Richman, D. D. (2018). Quantitation of Integrated HIV Provirus by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Droplet Digital PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(12). https://doi.org/10.1128/JCM.01158-18

171. Caviglia, G. P., Abate, M. L., Tandoi, F., Ciancio, A., Amoroso, A., Salizzoni, M., Saracco, G. M., Rizzetto, M., Romagnoli, R., & Smedile, A. (2018). Quantitation of

HBV cccDNA in anti-HBc-positive liver donors by droplet digital PCR: A new tool to detect occult infection. *Journal of Hepatology*, *69*(2), 301–307. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.021

172. Dong, G., Meng, F., Zhang, Y., Cui, Z., Lidan, H., Chang, S., & Zhao, P. (2019). Development and evaluation of a droplet digital PCR assay for the detection of fowl adenovirus serotypes 4 and 10 in attenuated vaccines. *Journal of Virological Methods*, *265*(August 2018), 59–65. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.09.005

173. Kishida, N., Noda, N., Haramoto, E., Kawaharasaki, M., Akiba, M., & Sekiguchi, Y. (2014). Quantitative detection of human enteric adenoviruses in river water by microfluidic digital polymerase chain reaction. *Water Science and Technology*, *70*(3), 555–560. https://doi.org/10.2166/wst.2014.262

174. Sedji, M. I., Varbanov, M., Meo, M., Colin, M., Mathieu, L., & Bertrand, I. (2018). Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(30), 30497–30507. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3045-4

175. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(5), 1014–1026. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

176. Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics*, *6*(3), 297–305. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006

177. Sedlak, R. H., Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2014). A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *80*(4), 285–286. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.004

178. Ahmed, W., Smith, W. J. M., Metcalfe, S., Jackson, G., Choi, P. M., Morrison, M., Field, D., Gyawali, P., Bivins, A., Bibby, K., & Simpson, S. L. (2022). Comparison of RT-qPCR and RT-dPCR Platforms for the Trace Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater. *ACS ES&T Water*, *2*(11), 1871–1880.

https://doi.org/10.1021/acsestwater.1c00387

179. Leth, T. A., Joensen, S. M., Thomsen, M. B., & Møller, J. K. (2022). Establishment of a digital PCR method for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato complex DNA in cerebrospinal fluid. *Scientific Reports*, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-022-24041-8

180. Kayalar, Ö., Arı, A., Babuççu, G., Konyalılar, N., Doğan, Ö., Can, F., Şahin, Ü. A., Gaga, E. O., Levent Kuzu, S., Arı, P. E., Odabaşı, M., Taşdemir, Y., Sıddık Cindoruk, S., Esen, F., Sakın, E., Çalışkan, B., Tecer, L. H., Fıçıcı, M., Altın, A., … Bayram, H. (2021). Existence of SARS-CoV-2 RNA on ambient particulate matter samples: A nationwide study in Turkey. *Science of The Total Environment, 789*, 147976. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147976

181. Yücel, D. (2014). Pratik metot validasyonu ve verifikasyonu. Içinde *Türk Biyokimya Derneği*. http://www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/upload/48/Dosyalar/tmp/Metot.Validasyonu.pdf

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

İNSAN ADENOVİRUS DNA'SININ MUTLAK KANTİTASYONU İÇİN DİJİTAL PCR YÖNTEMİNE DAYALI BİR TEST FORMATININ GELİŞTİRİLMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%5	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%2
3	Balázs Harrach, Mária Benkő. "Adenoviridae", Elsevier BV, 2020 Yayın	<%1
4	Olli Ruuskanen, Jordan P. Metcalf, Matti Waris, Göran Akusjärvi. "Adenoviruses", American Society for Microbiology, 2016 Yayın	<%1
5	gimnastika.pro İnternet Kaynağı	<%1
6	www.oxfordglobal.co.uk İnternet Kaynağı	<%1
7	S. Behera, R. Rana, P. K. Gupta, D. Kumar, Sonal, V. Rekha, T. R. Arun, D. Jena.	<%1