BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YENİLİKÇİ VE YERLİ NÜKLEİK ASİT TABANLI TANI SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

HAZIRLAYAN

BURCU ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA-2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YENİLİKÇİ VE YERLİ NÜKLEİK ASİT TABANLI TANI SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

HAZIRLAYAN

BURCU ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ OĞUZ BALCI

ANKARA-2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Burcu ASLAN tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07 / 06 / 2024

Tez Adı: Yenilikçi ve Yerli Nükleik Asit Tabanlı Tanı Sisteminin Geliştirilmesi

Tez Jüri Üyeleri	**İmza**
Dr. Öğretim Üyesi Oğuz BALCI, Başkent Üniversitesi	……...
Dr. Öğretim Üyesi Emre AKSOY, Orta Doğu Teknik Üniversitesi	……...
Dr. Öğretim Üyesi Özge ERDEMLİ, Başkent Üniversitesi	……...

ONAY

Prof Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU
Enstitü Müdürü
Tarih: … / … / ……..

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORİJİNALLİK RAPORU

Tarih: 08/07 / 2024

Öğrencinin Adı, Soyadı: Burcu ASLAN

Öğrencinin Numarası: 22120035

Anabilim Dalı: Biyoteknoloji

Programı: Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Ünvanı/Adı, Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Oğuz Balcı

Tez Başlığı: Yenilikçi ve Yerli Nükleik Asit Tabanlı Tanı Sisteminin Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 46 sayfalık kısmına ilişkin, 08 / 07 / 2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1'dir. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:…….

ONAY

Tez Danışmanı

Dr. Öğretim Üyesi Oğuz BALCI

……

Tarih: 08 / 07 / 2024

Bu tezi yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen canım aileme ve sevgili arkadaşım Pelin Oral'a ithaf ediyorum.

Burcu ASLAN

Ankara-2024

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini her zaman gördüğüm ve bilgi birikimiyle her zaman rehberlik eden tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Oğuz BALCI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam kapsamında yatırım ve deney ortamı desteği sağlayan Denovo Biyoteknoloji şirketine teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Öğretim Üyesi Emre AKSOY (Orta Doğu Teknik Üniversitesi) ve Dr. Öğretim Üyesi Özge ERDEMLİ (Başkent Üniversitesi) değerli hocalarıma sağlamış oldukları tez danışmanlıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteğini ve sabrını gördüğüm canım anneme ve babama, sevgili ablam Buket Deniz ASLAN, sevgili kardeşim Mustafa Emre ASLAN ve sevgili arkadaşım Pelin ORAL'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Burcu ASLAN

YENİLİKÇİ VE YERLİ NÜKLEİK ASİT TABANLI TANI SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

2024

Dünyada en sık enfeksiyona sebep olan virüslerden biri olan sitomegalovirüsün (CMV), tek bulaş kaynağı insan olmakla birlikte yakın ve cinsel temas, plasenta, genital segresyon, anne sütü ve tükürük ile bulaşmaktadır. Enfeksiyon belirtileri konağın çeşidine göre değişmekte olup, konjenital, normal ve bağışıklığı baskılanmış konak olarak üç ayrı gruba ayrılmaktadır. Konjenital ve bağışıklığı baskılanmış konaklarda ciddi klinik tablolara yol açan bu virüsün tanısı için serolojik ve moleküler testler kullanılmaktadır. Ancak serolojik testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olması nedeniyle moleküler testler günümüzde daha sık tercih edilmektedir. Moleküler testler arasından en çok tercih edilen Real-Time PCR yöntemidir; fakat bu tanı sistemi çok pahalı olduğundan toplum kolayca ulaşamamaktadır. Bu sebeple çalışmada, CMV için end-point özellikli Denovo cihazda çalışan tek florofor boya içeren yarı maliyetli kit geliştirmek ve doğrulama çalışmasını yapmak amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında CMV'ye özgü primerler ve prob tasarlanmıştır. Doğrulama çalışmaları kapsamında cut-off skoru (36,198), limit of detection değeri 279 kopya/ml elde edilmiştir. Analitik özgüllük oranı %100, tanısal özgüllük oranı %95,2 ve tanısal duyarlılık oranı %96,3 elde edilmiştir. Bu değerler, tanı testlerinde hedef başarı kriteri %95 ve üzeri olması nedeniyle başarılı olarak kabul edilmiştir. Kesinlik doğrulamasında varyasyon katsayı değeri %3,12 olarak hesaplanmış, tanı testlerinde kesinlik hedef başarı kriteri %5 ve aşağısı olması nedeniyle sistem kesinlik açısından da başarılı kabul edilmiştir. Doğrusal aralık tayininde R^2 değeri 0,993 olarak elde edilmiş, sistem doğrusal kabul edilmiştir. Bu çalışma gelecek dönemlerde daha büyük örneklem grubuyla veya başka ticari kitler ile karşılaştırma deneyleri şeklinde farklı bir çalışma olarak dizayn edilebilir.

ANAHTAR KELİMELER: Sitomegalovirüs, doğrulama, Real-Time PCR, tanı, eşik değeri, saptama limiti, klinik duyarlılık, klinik özgüllük

TÜBİTAK 1170446 Destek Programı, Denovo Biyoteknoloji Şirketi, Başkent Üniversitesi

ABSTRACT

Burcu ASLAN

DEVELOPMENT OF AN INNOVATIVE AND DOMESTIC NUCLEIC ACID-BASED DIAGNOSTIC SYSTEM

Başkent University Institute of Science

Department of Biotechnology

2024

Cytomegalovirus (CMV) is, one of the viruses that causes most prevalent infections in the world and its single source of transmission humans. It can be transmitted by close and sexual contact, placenta, genital segregation, breast milk, and saliva. The signs of infection change depending on the kind of host, and are categorized into three distinct groups: congenital, normal, and immunosuppressive hosts. In congenital and immunosuppressive hosts, this virus can cause serious clinical cases, and its detection depends on serological and molecular tests. Nevertheless, because of the low sensivity and specificity of serological tests, molecular tests are more commonly chosen nowadays. The most favored molecular test among them is Real-Time PCR technique. However, this diagnostic system is not simply available by the public due to its high cost. Thus, this study aims to develop a half-cost diagnosis kit running on low-cost Denovo end-point PCR device, and perform a validation study of the developed diagnostic kit. Within the framework of the study, the primers and probe were formulated specific to CMV. In the context of validation studies, a cut-off score of 36.198, and limit of detection value of 279 copies/ml have been acquired. The analytical specificity ratio was 100%, the diagnostic specificity ratio was 95.2%, and the diagnostic sensitivity ratio was 96.3%. These values were regarded as successful because a goal success criterion in diagnostic tests is 95% or higher. The coefficient of variation value was calculated 3.12% in precision validation, and the system was regarded as successful with regard to precision because precision goal success criterion in diagnostic tests was 5% and below. In the lineer range determination, R^2 value was acquired as 0.993, and the system was seen as linear. For future work, this study can be further examined with a larger sample size or a comparison study with existing diagnostic kits.

KEYWORDS: Cytomegalovirus, validation, Real-Time PCR, diagnosis, cut-off score, limit of detection, diagnostic specificity, diagnostic sensitivity

TUBITAK 1170446 Support Program, Denovo Biotechnology Company, Başkent University

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
ÖZET ii
ABSTRACT iv
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ x
1. GİRİŞ 11
1.1 Sitomegalovirüs (CMV) 11
1.2. Tanı Yöntemleri 13
1.2.1. Serolojik ve kültür test yöntemleri 13
1.2.2. Moleküler testler ve çeşitleri 14
1.3. Doğrulama ve Parametreleri 16
1.4. Tezin Amacı ve Hedefleri 19
1.4.1. Tez hipotezi 1 19
1.4.2. Tez hipotezi 2 19
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 28
3.1. Gereç 28
3.2. Yöntem 28
3.2.1. Primer ve prob dizaynı 28
3.2.2. Verilerin Analizi 29
3.2.3. Cut-off skoru 30
3.2.4. Analitik duyarlılık 30
3.2.5. Analitik özgüllük 31
3.2.6. Doğrusal aralık 31
3.2.7. Kesinlik 31
3.2.8. Tanısal duyarlılık ve tanısal özgüllük 32
4. SONUÇLAR 33
4.1. Primerler ve Prob 33
4.2. Cut-off Skoru 33
4.3. Limit of Detection 36

4.4. Analitik Özgüllük.....39
4.5. Doğrusal Aralık.....41
4.6. Kesinlik.....42
4.7. Tanısal Duyarlılık ve Tanısal Özgüllük 44
5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER 48
6. SONUÇ.....56
KAYNAKLAR.....58

EKLER

EK 1: Patojen, Aile, Cins, Tür Bilgileri
EK 2: Viral Yüklerin 12 Tekrar Deney Sonuçları
EK 3: Patojenlerin 12 Tekrar Deney Sonuçları

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Kimyasallar…….28

Tablo 4. 1. İleri, geri primerler ve prob tasarımları 33

Tablo 4. 2.Negatif numunelerin floresan yoğunluk okuma değerleri. 34

Tablo 4. 3. Pozitif numunelerin floresan yoğunluk okuma değerleri. 35

Tablo 4. 4. Cut-off skoru hesaplanması 35

Tablo 4. 5. Prototip sistem cevaplama oranları 37

Tablo 4. 6. Probit değerleri 38

Tablo 4. 7. Probit ve LoD değerleri 38

Tablo 4. 8.Farklı patojenlerin floresan yoğunluk okuma sonuçları. 40

Tablo 4. 9. Standart numunelerin floresan yoğunluk okuma sonuçları 42

Tablo 4. 10. Standart numunenin prototip sistem ile viral yük sonuçları 43

Tablo 4. 11. Varyasyon katsayısı değeri hesaplaması. 43

Tablo 4. 12. Negatif numunelerin floresan yoğunluk okuma değerleri. 45

Tablo 4. 13. Pozitif numunelerin floresan yoğunluk okumaları ve viral yük miktarları. 46

Tablo 4. 14. Tanısal özgüllük ve duyarlılık değerleri. 47

Tablo 5. 1. CMV PCR tanı kitleri performans değerleri……..55

Tablo 5.2. CMV PCR tanı kitleri test sayıları ve fiyatları……...55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4. 1. Viral yük miktarlarına denk gelen floresan yoğunluk okuma değerleri.....37

Şekil 4. 2.Viral yük miktarlarına denk gelen probit değerleri. 38

Şekil 4. 3. Viral yük miktarlarına denk gelen floresan yoğunluk değerleri 42

Şekil 4. 4. Viral yük miktarlarına karşı denk gelen prototip sistem viral yük miktarları. ...47

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
CMV	Cytomegalovirus ‘’Sitomegalovirüs’’
Ct	Cycle Threshold ‘’Döngü Eşiği’’
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit Trifosfat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
IgG	İmmünoglobülin G
IgM	İmmünoglobülin M
KC1	Potasyum Klorür
LFA	Lateral Flow Assay ‘’Lateral Akım Testi’’
LoD	Limit of Detection
$MgC1_2$	Magnezyum Klorür
NAC1	Sodyum Klorür
Nt	Nükleotit
PCR	Polymerase Chain Reaction ‘’Polimeraz Zincir Reaksiyonu’’
SD	Standard Deviation ‘’Standart Sapma’’

1. GİRİŞ

1.1 Sitomegalovirüs (CMV)

İnsan sitomegalovirüsü (CMV) Herpes ailesine ait çift zincirli DNA virüsüdür [1]. İnsan vücudunda latent olarak kalmaktadır ve ilerleyen dönemlerde ikincil enfeksiyonlara neden olabilmektedir [3]. Dünyada en yaygın enfeksiyona sebep olan virüsler arasında yer almakla birlikte yapılan bir metaanaliz çalışmasında dünya geneli seroprevelansı %83 olarak bulunmuştur [33]. Virüs yakın temas veya cinsel yolla bulaşabilmektedir [31]. Konaklarda verdiği semptomlar konak özelliklere göre değişmektedir [30]. Normal konak, konjenital konak ve immünosüpresif konak olmak üzere üç konak çeşidi vardır [30]. Normal konaklarda genellikle semptom vermemekle birlikte ateş ve halsizlik gibi soğuk algınlığına benzer semptomlar görülebilmektedir [3, 7]. Konjenital ve kemik iliği, organ nakli gibi bağışıklığı baskılanmış konaklarda ağır semptomlar verebilmekte hatta ölümle dahi sonuçlanabilmektedir [3]. Konjenital CMV enfeksiyonu enfekte anneden bebeğe virüsün doğum esnasında genital segresyon, plasenta veya doğumun ilk haftalarında anne sütü, yakın temasla bulaşması ile gerçekleşmektedir [2]. Enfekte annelerden bebeğe bulaşma oranı %1 ile %2 arasında olmasına rağmen, yenidoğanlar arasında ciddi malformasyonlara neden olan bir virüstür [1, 24]. Enfekte bebeklerin yaklaşık %10'nunda semptom verirken, semptom vermeyen bebeklerin yaklaşık %10-15'inde yaşamın ilerleyen dönemlerinde semptom görülebilmektedir [10]. Konjenital konakta enfeksiyon sensorinöral işitme kaybı, mikrosefali, zeka geriliği, vb. nörogelişimsel sorunlarla birlikte duygusal bozukluklara yol açabilmektedir [8]. Bu yüzden hastalığın tanısı çok önemlidir. Yapılan bir çalışmada, konjenital CMV enfeksiyonu en yüksek Çin ve Gamboçya'da gözlenmekle birlikte seroprevelans oranı %90 bulunmuştur ve enfekte bebeklerin %48-50'sinde nörologelişimsel bozukluklar gözlendiğini rapor edilmiştir [2]. CMV seropozitifliğini yaş cinsiyet, ırk ve sosyoekonomik düzey etmenleri önemli ölçüde etkilemektedir [6, 8]. Brezilya'nın Sao Paulo kentinde yapılan bir çalışmada 30 yaş ve üzerindeki yetişkinlerde CMV seropozitiflik oranı %90, ülkemizde yapılan bir çalışmada ise 16 yaş ve üzerindeki yetişkinlerde ise CMV seropozitiflik oranı %100 olarak bulunmuştur [6]. CMV cinsiyet faktörü açısından kadınlarda nispeten erkeklere göre daha yaygın görülmektedir. [8] Sosyoekonomik faktörün CMV enfeksiyonu seroprevelansı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan bir araştırmada; CMV seroprevalansı en yüksek Güney Amerika, Afrika ve Asya' da

görülürken, en düşük Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde görülmektedir [8].

CMV enfeksiyonu gelişmekte olan ülkelerde işitme kaybı ve nörogelişimsel bozuklukların ana nedeni olup, dünyada ciddi anomalilere sebep olan hastalıklar arasında Serebral Palsi'den sonra ikinci sırada yer almaktadır [8, 14]. Amerika'da her yıl 20000'den fazla konjenital CMV enfeksiyonlu bebek dünyaya gelmekte ve bu bebeklerin 3000'den fazlasında nörogelişimsel bozukluklara sahip olmakla birlikte çocukluk dönemi sensörinöral işitme kayıplarının %10 ile %25'i CMV enfeksiyonundan kaynaklanmaktadır [28].

CMV enfeksiyonu dünya genelinde sık görülen bir enfeksiyondur [32]. Bağışıklığı baskılanmış ve konjenital konaklarda ağır klinik tablolar görülmesinden dolayı bu enfeksiyonun tanısı hızlı, ucuz ve güvenilir olmalıdır [32]. Mevcut tanı yöntemleri arasında serolojik testler, kültür testleri ve moleküler testler bulunmaktadır [5]. Serolojik ve kültür testleri hızlı ve düşük maliyetli olmalarına karşın duyarlılıkları ve özgüllükleri düşük olması sebebiyle moleküler testlere göre daha az tercih edilmektedir [4]. Moleküler test yöntemi olan PCR testinin ise duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olmasına rağmen zaman alıcı olması, kalifiyeli elemana ihtiyaç olması ve kontaminasyon riskinin yüksek olması gibi dezavantajları vardır [20]. Bir diğer moleküler test çeşidi olan Real-Time PCR yöntemi ise hızlı, kontaminasyon riski düşük, güvenilirliği yüksek olmasına karşın test cihazının çok pahalı bir sistem olmasından dolayı çoğu tanı laboratuvarı bu tanı yöntemine ulaşamamaktadır [11]. Bu amaçla bu tez kapsamında, çok uygun fiyatlı Denovo marka end-point PCR cihazda çalışan tek florofor boyalı uygun fiyatlı tanı kiti geliştirmek ve doğrulama çalışmasını yapmaktır. End-point PCR cihazı sayesinde testin en son noktasında floresan sinyal ölçümü ile sonuç alınabilmektedir. Bu yüzden Konvansiyonel PCR cihazlarındaki jel elektroforez analizine gerek kalmadığından dolayı sonuçlar hızlı ve güvenilir elde edilir. Geliştirilen tanı kitinin piyasadaki tanı kitlerine göre uygun fiyatlı olması, uygun fiyatlı end-point PCR cihazında çalışması nedeniyle çoğu tanı merkezi bu tanı sistemine ulaşabilecek ve hastalığın tanısı hızlı, düşük maliyetli olacaktır. Geliştirilen bu tanı kiti sayesinde toplumda bu denli yaygın ve önemli sonuçlara sebep olan CMV enfeksiyonu hızlı ve güvenilir olarak tanılanacaktır.

1.2. Tanı Yöntemleri

CMV enfeksiyonu konjenital ve bağışıklığı baskılanmış konaklarda hayati semptomlar vermesi nedeniyle hastaya verilecek olan tedavinin belirlenebilmesi için konakların hızlı tanılanması gerekmektedir. CMV enfeksiyonu tanısında serolojik, kültür ve moleküler testler kullanılmaktadır [30]. Yüksek duyarlılığa ve özgüllüğüne sahip olması nedeniyle moleküler testler son zamanlarda sık tercih edilmektedir [22].

1.2.1. Serolojik ve kültür test yöntemleri

Serolojik test çeşitlerinden biri olan antijen testleri ile virüsün antijenleri hızlı ve kolay bir şekilde tespit edilebilmektedir [31]. Antijen testlerinde virüse karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılır [31]. Ancak düşük viral yük miktarlarında yalancı negatif ve kontaminasyona açık sistem olmalarından çapraz reaksiyon sonucu yalancı pozitif sonuç alınabilmektedir [78]. Bu sebeple antijen testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü moleküler testlere göre daha düşük elde edilmektedir [21]. Antikor testleri ile virüse karşı geliştirilen antikor titreleri ölçümü yapılmaktadır. Enzim-bağlı immünosorbent testi (ELISA) ve lateral akım testi (LFA) CMV enfeksiyonu tanısında kullanılan serolojik testlerdendir [9]. LFA test yönteminde virüse spesifik antikorlar kullanılır. Viral patojen sahip numunedeki antikorların spesifik antikorlar ile komplekse girmesi sonucunda spesifik çizgi oluşur ve bu çizgi analiz edilerek test değerlendirilmesi yapılır [77]. ELISA testi virüse karşı geliştirilen immüno globülin M (IgM) ve immüno globülin G (IgG) antikorlarının titre değişimini ölçümleyerek tanı konulabilmesi sağlamaktadır [9, 17]. Test sisteminde virüse karşı geliştirilmiş antijenler kullanılır. Numune test kuyucuklarına eklendiğinde antikor içermesi durumunda test sistemindeki antijenlerle kompleks yapı oluşturur. Bu kompleks yapı üzerine anti-insan antikorları eklenir ve meydana gelen renk değişimi spektrofotometre ile ölçülür [77]. Ancak enfeksiyon başlangıcında antikor titrelerinin yükselmemesi hastalığın geç teşhisine neden olabilmektedir [47]. Antikor ve antijen testleri hızlı, kolay ve düşük maliyetli olması gibi avantajlarına rağmen yalancı pozitif ve negatif sonuçlar vermeleri nedeniyle hassasiyetleri ve duyarlılıkları düşük olmaktadır [21]. Kültür testleri ile kan ve idrardan izole edilen CMV laboratuvar ortamında çoğaltılarak tanı konulmaktadır [50, 51]. Ancak bu yönteminde duyarlılığı ve özgüllüğü moleküler testlere göre oldukça düşük olmaktadır [50, 51].

1.2.2. Moleküler testler ve çeşitleri

CMV enfeksiyonu tanısında hızlı, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle Polimeraz Zincir Reaksiyon (Polymerase Chain Reaction, PCR) testleri altın standart olarak kabul edilmektedir [20]. Enfeksiyon tanısında hastanın sahip olduğu viral yük miktarı tedavi kararı vermede ve tedavinin seyri açısından önemli bir faktör olduğundan dolayı kantitatif sonuç veren Real-Time PCR testleri sık tercih edilmektedir [36].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş ve Nobel Kimya ödülüne layık görülmüştür [29]. Reaksiyon, kopyası elde edilmek istenen hedef DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasına dayanan bir tekniktir. Genetik ve viral hastalıkların tanısı, DNA dizi analizi, parmak izi tespiti, babalık testi ve insan genom projeleri PCR yönteminin yaygın kullanıldığı alanlardır [29]. Geleneksel PCR yönteminde hedef DNA bölgesi ekstraksiyon ile elde edilerek reaksiyon tüpüne konulmaktadır. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için hedefe özgü tasarlanmış sentetik primerler, dNTP (deoksinükleotit trifosfat) buffer, $MgC1_2$, distile su ve ısıya dayanıklı *Taq* polimeraz enzimi aynı reaksiyon tüpü içerisinde yer almaktadır [29]. Hazırlanan karışım farklı sıcaklık döngülerinin gerçekleşebilmesini sağlayan termal döngü cihazına konulur. PCR reaksiyonu bu cihaz içinde 3 farklı basamakta ve sıcaklıkta döngüler halinde tekrar edilmesi ile gerçekleşmektedir [20]. Denatürasyon, bağlanma ve uzatma basamakları bir PCR döngüsünü oluşturmaktadır [20]. Bu 3 basamak bir döngüyü oluşturur ve bu döngü cihaz tarafından defalarca kez gerçekleştirilir [20]. Sonuç olarak hedef DNA bölgesi içeren milyonlarca kopya edilir. Elde edilen ürünlerin analizi agoraz veya poliakrilamid jel üzerinde yürütülmesi ve daha sonra etidyüm bromür gibi floresan boyalar ile boyanması ile elde edilen bant görüntülerinin yorumlanmasına dayanır [45]. Ancak bu analiz işlemlerinin zaman alıcı, kontaminasyona açık olması, güvenilir kantitasyon yapılamaması, duyarlılığı ve özgüllüğünün düşük olmasından dolayı Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir [36, 44].

Real-Time PCR yönteminde reaksiyon ile analiz aynı deney tüpünde eş zamanlı olarak gerçekleşmesi nedeniyle kontaminasyon riski Geleneksel PCR yöntemine göre düşüktür ve PCR sonrası jel elektroforez yöntemlerine gerek olmadığından dolayı hızlıdır [16]. Günümüzde viral hastalıkların tanısında viral yük miktarı hastalığın ve tedavinin seyri açısından belirleyici bir etmen olması nedeniyle kantitatif sonuç veren Real Time PCR sık tercih edilmektedir [19]. Geleneksel PCR cihazından farklı olarak Real Time PCR cihazında

reaksiyon esnasında oluşan ürünlerin oluşmasıyla eş zamanlı oluşan floresan sinyalleri saptayan floresan deteksiyon sistemi ve amplifiye edilen ürünlerin analizini yapabilmek için DNA amfikasyon eğrilerini çizen yazılım sistemi bulunmaktadır [18, 39]. Reaksiyon esnasında oluşan floresan sinyalleri bilgisayar yazılım sistemi ile sayısal değerlere dönüştürülür [36]. Bu sayısal değerlerden en önemli değişken reaksiyon esnasında anlamlı ilk ürün miktarının görüldüğü Ct (cycle threshold) olarak bilinen eşik döngü değeridir ve bu değerden sonra ürün artışı eksponensiyal faza girecektir [19, 29, 40]. Amplifiye edilen ürünlerin miktar analizi kopya sayısı bilinen standart örneklere ait çizilen standart eğrilerin Ct değerleri ile reaksiyon sonucunda elde edilen ürünleri ct değerleri karşılaştırılarak kantitatif analiz yapılır [23, 29, 36]. Reaksiyon esnasında floresan ışımanın oluşabilmesi için hedefe özgü olmayan floresans boyalar veya hedefe özgü tasarlanan problar kullanılmaktadır [27]. Hedefe özgü olmayan boyalar arasında en sık tercih edilen boya SYBR Green I'dir. SYBR Green I reaksiyon esnasında oluşan tüm çift zincirli ürünlere bağlanır [27]. Hedefe özgü tasarlanan problar reaksiyon esnasında oluşan tüm çift zincirli bölgelere değil, sadece spesifik tasarlandıkları bölgeye bağlanırlar [60, 61]. *Taq*Man, FRET (Floresans Resonance Energy Transfer) ve Moleküler Beacon probları hedef özgü tasarlanan prob çeşitleridir [60,61]. Bu prob çeşitleri arasından en sık kullanılan *Taq*Man probtur [27, 38]. Taqman prob, 5' ucunda raportör flokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı flokrom içeren çift işaretli uçlu probtur [60]. Reaksiyon aşamasında primerlerin bağlandıkları bölge arasında kalan bölgeye bağlanırlar ve tavlama aşamasında primerlerin uzaması için *Taq* polimeraz enzimi serbest dNTP'leri eklerken, probun bağlandığı bölgeye geldiğinde 5'-3' ekzonükleaz işleviyle probu 5' ucunda yıkmaya başlar [23, 38]. 5' ucundaki raportör kısım, 3' ucundaki baskılayıcı kısımdan ayrılır ve serbest hale geçerek ışıma oluşturur [19, 38]. Reaksiyon esnasında probun raportör kısmı, baskılayıcı kısımdan ayrılamazsa baskılayıcı kısımın raportör kısımı inhibe etmesi nedeniyle ışıma oluşamayacaktır [38].

Real-Time PCR yöntemi rutin kullanımda en çok tercih edilen yöntem olsa da Multipleks, Nested, Revers ve Dijital PCR test çeşitleri de kullanılmaktadır [44, 74]. Multipleks PCR yönteminde ise aynı anda birden fazla hedef bölgenin çoğaltılması sağlanmaktadır [71, 73]. Bu yöntemde konvansiyonel PCR yönteminden farklı olarak farklı hedef dizilere tamamlayıcı çoklu primer dizileri kullanılır [43, 46]. Nested PCR, başlangıç hedef miktarının az olduğu veya reaksiyonda inhibitor fazlalığı olmasından dolayı istenilen düzeyde ürünlerin elde edilememesi durumda uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem iki aşamalı amfikasyon döngüsünden oluşmaktadır [77]. Revers Transkripsiyon PCR (RT-

PCR), çoğaltılmak istenen hedef dizi RNA olduğunda kullanılan yöntemdir [65, 66]. Diğer PCR çeşitlerinde genellikle DNA amplifiye edildiğinden dolayı, RNA kaynaklı diziler bu çeşitlerde çoğaltılamamaktadır [65,66,67]. Bu sorunu çözmek amacıyla RT-PCR tekniği geliştirilmiştir. Bu teknikte hedef RNA dizisi revers transkripsiyon ile öncelikle cDNA'ya dönüştürülür ve daha sonra cDNA, PCR amfikasyonu ile çoğaltılır [69, 70]. Dijital PCR, düşük miktarlarda olan DNA konsantrasyonlarının yüksek duyarlılıkta amplifiye edilmesi sağlayan ve kantitatif sonuç veren PCR çeşididir [75]. Bu yöntemde amplifiye edilecek dizi dilüsyon edilerek binlerce kuyucuğa damlatılmaktadır. Hedef ürünü içeren kuyucuklarda amfikasyon gerçekleşmekte ve bu sayede pozitif sinyal elde edilmektedir. Hedef ürünü içermeyen kuyucuklarda ise amfikasyon gerçekleşmemekte ve bununla birlikte negatif sinyal elde edilmektedir [70].

1.3. Doğrulama ve Parametreleri

Yeni geliştirilen veya değiştirilen test veya test prosedürünün amaca uygunluğunun test edilmesi gerekir [48]. Bu kapsamda geliştirilen prosedürün cut-off skoru, analitik özgüllük, analitik duyarlılık, doğruluk, sağlamlık, kesinlik, uygulanabilirlik, pratiklik, klinik duyarlık ve özgüllük parametrelerinin açıklanması gerekir [41].

Cut-off skoru geliştirilen yöntemin test ettiği değerlerin pozitif ve negatif olarak sınıflandırılmasını sağlamaktadır [89]. İyi geliştilen bir yöntemin cut-off skoru tüm pozitifleri pozitif, tüm negatifleri negatif olarak sınıflandırmalıdır. Cut-off skoru ortalama ±2 standart sapma yöntemi ile %95 güven aralığında elde edilmektedir [89]. Ortalama, sayı kümesindeki veri değerlerinin toplamının veri sayısına bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Standart sapma ise verilerin ortalama değer etrafındaki yayılımlarının ölçüsüdür. Standart sapma hesaplanırken ilk olarak veri setinin ortalaması hesaplanır, her bir veri ile ortalama arasındaki fark bulunur. Hesaplanan her bir farkın karesi alınır ve toplanır. Elde edilen toplam, veri sayısının bir eksiğine bölünür ve sonucun karekökü standart sapmaya eşittir. Ortalama ±2 standart sapma yöntemi ile cut-off skoru, değerlerin ortalamadan ±2 standart sapmada denk geldiği noktalar hesaplanmaktadır ve bu değerler %95'lik güven aralığındadır [89].

Analitik özgüllük, geliştirilen yöntemin yalnızca hedefi test etme, hedef olmayan analitlerle çapraz reaksiyona girmeme ölçüsüdür [42]. Yöntemin çapraz reaksiyona girmesi

sonucunda yalancı negatif ve pozitif sonuçlar elde edileceğinden dolayı özgüllüğü düşük elde edilecektir. Geliştirilen yöntemin özgüllüğü yüksek olabilmesi için sadece hedef analiti test etmelidir [34].

Analitik duyarlılık, geliştirilen yöntemin hedef analiti en düşük konsantrasyonlarda tespit edebilme yeteneğidir [49]. Yöntemin duyarlılık hesaplanmasında Limit of Detection (LoD) değeri hesaplanması gerekir. LoD, hedef analitin %95'lik güven düzeyinde saptandığı en düşük konsantrasyon değeridir [52, 53, 54]. LoD, genellikle kopya/ml olarak ölçülür. Düşük analit konsantrasyonundaki LoD değeri, testin duyarlılığını arttırmasından dolayı önemlidir [52]. Literatüre bakıldığında LoD değeri hesaplaması istatiksel ve ampirik olarak yapılırken, genellikle laboratuvarlar ampirik hesaplama yöntemini kullanmaktadır [52]. Ampirik hesaplama çeşidi olan probit analizi ile LoD hesaplanması yaygın olarak yapılmaktadır [52]. Probit analizi ilk olarak tarımda böceklere uygulanan ilaç dozu yanıtlarının gözlenmesi amacıyla kullanılmıştır [87, 88]. Böceklere uygulanan ilaca karşı yanıt cevaplarının gözlenmesi amacıyla çizilen eğrinin sigmoid bir eğri oluşturmuş ancak regresyon analizi sadece doğrusal eğriler ile yapılmaktadır [88]. Bu yüzden sigmoid doz-yanıt eğrisinin düz doğrusal eğriye dönüştürülmesi gerekmiştir ve probit analizi sayesinde sigmoid eğri doğrusal düz eğriye dönüştürülmüştür [88]. Bu dönüşüm yapılırken Finney tarafından geliştirilen olasılık yüzdelere karşı denk gelen probit yanıtları kullanılmıştır [88]. Günümüzde de doz yanıt ilişkilerinin analizinde hala probit analizi sık tercih edilmektedir [88]. LoD değeri hesaplanmasında ise sistemin patojene karşı verdiği cevap yüzdelerinin doğrusal olmaması durumunda probit analizi kullanılmaktadır [49]. Cevap yüzdelerine denk gelen probit değerleri, Finney tarafından geliştirilen probit dönüşüm tablosunda bulunur ve bu değerler kullanılarak LoD hesabı yapılmaktadır [49].

Analitik duyarlılık, sıfır sonuçtan ayırt edilebilen ve tespit edilebilen en az sayıda nükleik asit molekülünü ifade eder ve en iyi şekilde tahlil aralığını belirleyen standart eğri kullanılarak hesaplanır [59]. Standart eğri tarafından belirlenen hedefin üst ve alt konsantrasyonunun önemli ölçüde dışında kalan sonuçların bildirilmesi uygun değildir [68].

Tanısal duyarlılık, yöntemin gerçek pozitifleri saptama ölçüsü olarak tanımlanmaktadır [52, 55]. Tanısal testler için hedef başarı kriteri %95 ve üzeri tanısal duyarlılık oranına sahip olmasıdır [59].

Tanısal özgüllük, yöntemin gerçek negatifleri saptama yeteneğidir [52, 55]. Viral hastalıklarda test esnasında kontaminasyona bağlı olarak yalancı pozitif sonuçlar elde edilmesi tanısal özgüllüğü azaltan bir faktördür [52, 55]. Tanısal testler için hedef başarı kriteri %95 ve üzeri tanısal duyarlılık oranına sahip olmasıdır [59].

Sağlamlık, yöntemin deney koşullarındaki minimum değişiklerden etkilenmeme kapasitesinin ölçüsüdür. Sağlamlık parametresi en çok etkileyen değişkenler sıcaklık ve pH'dır [48].

Uygulanabilirlik, yöntemin farklı koşullarda uygulanabilmesine dair gerekli olan tanımdır [91].

Pratiklik; yöntemin varolan laboratuvar, cihaz ve personeller ile uygulanabilmesiyle beraber ek maliyet getirmemesidir [91].

Doğrusallık sistemin test ettiği analitine karşı verdiği cevapların doğrusal olmasıdır ve bu parametre doğrusal regresyon analizi ile elde edilir [35]. Doğrusal regresyon analizi ile analite karşı cevap oranları kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilir. Bu grafiğin bir R^2 değeri bulunmaktadır ve bu değer 0 ile 1 arasındadır. R^2 değeri 1'e yaklaştıkça sistemin doğrusallığı artmaktadır. Dinamik aralık ise güvenilir sonuç elde edilen konsantrasyon aralığıdır. Doğrusal regresyon analizi ile elde edilen verilerin x ve y ekseninde eğimi ve denklemi bilinen doğrusal eğrinin çizilmesi sağlanır [52].

Doğruluk, geliştirilen sistemin elde ettiği tekrarlı sonuçların ortalaması ile standart sistemden elde edilen sonuçların ortalaması arasındaki yakınlığın ölçüsüdür [52,56].

Kesinlik, geliştirilen yöntemin elde ettiği sonuçların farklı günlerde aynı laboratuvarlarda aynı elde edilmesi veya farklı laboratuvarlarda, farklı günlerle aynı elde edilme ölçüsüdür [58]. Başka bir deyişle kesinlik, bir ölçüm sonucunun tekrarlı olarak ölçülmesi halinde elde edilen sonuçlar arasındaki yakınlığın ölçüsüdür [52, 56, 57]. Kesinlik ölçüsünün belirlenmesinde varyasyon katsayısı değeri sık kullanılmaktadır. Varyasyon katsayısı elde edilen tekrarlı sonuçlar arasındaki değişim oranını temsil eden istatiksel yayılım ölçüsüdür [58]. Veri setinin standart sapma değerinin ortalama değere oranlanmasıyla elde edilmektedir. Tanı testlerinde kesinlik doğrulamasında hedef başarı

kriteri varyasyon katsayısı değerinin %5 ve altında olmasıdır [59].

1.4. Tezin Amacı ve Hedefleri

Tez çalışması kapsamında ülkemiz ve dünya genelinde oldukça yaygın olan CMV'ye özgü uygun fiyatlı tanı kiti geliştirmek ve doğrulama çalışmasını yapmak amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında geliştirilen tanı kitinin saptama sınırının (LoD) oldukça düşük, doğrusal ve kesin bir sistem olması hedeflenmiştir. Analitik özgüllük, tanısal duyarlılık ve tanısal özgüllük doğrulama test sonuçlarının ise %95 ve üzeri oranında olması hedeflenmiştir.

1.4.1. Tez hipotezi 1

Geliştirilen tanı kitinin doğrulama test sonuçları %95 ve üzerinde doğrusal ve kesin bir sistemdir.

1.4.2. Tez hipotezi 2

Geliştirilen tanı kiti uygun fiyatlıdır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Ülkemizde yetişkinlik dönemiyle beraber 40-50 yaş arası bireylerin %90'ı CMV enfeksiyonu önceden geçirmektedir [26]. Enfeksiyon konjenital ve bağışıklığı baskılanmış bireyde ciddi klinik tabloya neden olmaktadır [26, 30]. Ülkemizde son derece yaygın olan bu virüs için mevcut tanı yöntemleri arasında serolojik, kültür ve moleküler testler yer almaktadır. Serolojik ve kültür test yöntemleri enfeksiyon tanısında hızlı ve ucuz olmalarına karşın duyarlılık ve özgüllük değerleri moleküler testlere göre oldukça düşüktür [68]. Enfeksiyon tanısında kantitatif sonuç vermesi, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle Real-Time PCR yöntemi en çok tercih edilen test yöntemidir.

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında CMV tanısı için yeni geliştirilen ve doğrulama çalışması yapılan bir çok Real-Time PCR ve diğer PCR tanı kitleri bulunmaktadır. CMV tanısı için yeni geliştirilen Real-Time PCR tanı kitinin doğrulamasının yapıldığı çalışma kapsamında kitin duyarlılığı %97, özgüllüğü %99 olarak elde edildiği belirtilmiştir [14]. Çalışmada tanı kiti için deney koşulları optimize edilmiştir ve bu değerlerde kitin kullanılması gerektiği belirtilmiştir [14]. Başka bir çalışmada ise ideal deney koşulları sağlandığında CMV tanısı için yeni geliştirilen PCR testinin duyarlılığı (%89,2), özgüllüğü (%95,8) olarak elde edilmiştir [15]. Yapılan bir çalışmada ise CMV enfeksiyonu tanısında hassas ve kantitatif sonuç veren iki ticari Real-Time PCR tanı kitinin karşılaştırma çalışması 5 resmi kalite panelinde yapılmıştır [128]. Çalışma sonucunda iki ticari kitin kontrol paneliyle korelasyonu %100, R^2 değeri 0.99 elde edilmiştir. Bu bulgular iki ticari tanı kitinin CMV tanısında güvenilir sonuçlar verdiği desteklemektedir [128]. Kantitatif sonuç veren Real-Time PCR sistemlerin pahalı olması nedeniyle CMV tanısı için işaret bazlı Real-Time tanı kitinin geliştirildiği çalışmada ise 60 hastadan alınan 197 örnek kullanılmış ve bu örneklerin deney sonuçlarını karşılaştırmak amacıyla piyasada mevcut olan ticari Real-Time ve Konvensiyonel PCR tanı kiti kullanılmıştır [96]. Geliştirilen tanı kitinin özgüllüğü %100, duyarlılığı %96,3 ve ticari tanı kitleri ile korelasyonu %100 çıkmıştır [96]. Başka bir çalışmada ise piyasada olan 2 ticari Real-Time PCR tanı kitinin CMV enfeksiyonu tanısında performans karşılaştırılması yapılmıştır [99]. Çalışma sonucunda iki ticari kitin LoD değerleri 334 kopya/ml ve 437 kopya/ml olarak belirtilmiştir [99]. İki ticari kitin test sonuçları ticari tanı kitleri ile karşılaştırılmış ve %95 uyum elde edilmiştir [99]. CMV tanısında ticari Real-Time PCR sistemi ile Konvensiyonel PCR

yönteminin viral yük tayinini belirme açısından karşılaştırıldığı çalışma sonucunda aynı numune örneğinde Real-Time PCR sistemi Konvensiyonel PCR sistemine göre daha fazla viral yük tespit etmiştir [101]. Çalışma sonucunda CMV enfeksiyonu viral yük tayinininde Real-Time PCR yöntemi Konvensiyonel PCR yöntemine göre daha hassas sonuçlar elde ettiği belirtilmiştir [101]. Kore'de yapılan bir çalışmada ise yeni geliştirilen ticari Real-Time PCR tanı kiti ile Konvensiyonel PCR tanı kitinin karşılaştırılması 300 örnekle yapılmış ve çalışma sonucunda 296 örneğin test sonuçları her iki test kitinde uyumlu sonuçlar elde etmiştir [102]. Çalışmada ticari Real-Time PCR testinin doğrulama testleri de yapılmıştır ve kitin duyarlılığı (%97,4), özgüllüğü ise (%99,) elde edilerek %95 ve üzeri olan hedef başarı kriteri sağlamıştır [102]. Yeni geliştirilen ticari Real-Time PCR tanı kitinin doğrulama çalışması kapsamında doğrusallık ve kesinlik parametreleri test edilmiştir [103]. Geliştirilen tanı kiti doğrusal cevaplar vermiş ve kesinlik ölçüsü olan varyasyon katsayısı %16.61 elde edilmiştir [103]. Ancak varyasyon katsayısı değerinin %5 altında olmaması ilerleyen dönemlerde daha fazla örneklem grubuyla kesinlik doğrulamasının çalışılması belirtilmiştir [103]. Yeni geliştirilen CMV Real-Time PCR testinin duyarlılık ve özgüllük oranlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada ise 153 hasta örneği ile çalışılmıştır [106]. Çalışmada elde edilen sonuçlar referans kurum içi cihazla karşılaştırılmıştır [106]. Çalışma sonucunda Real-Time PCR kitinin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 elde edilmiştir [106]. Literatürde doğrulama çalışması yapılan yeni CMV Real-Time PCR tanı kitinin kesinlik, özgüllük ve doğrusallık parametreleri test edilmiştir [110]. Geliştirilen tanı kitinin doğrusallık testi regresyon analizi ile yapılmıştır ve bu analiz sonucu elde edilen doğrusallık ölçüsü olan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99 elde edilmiştir [110]. Bu değer 1'e oldukça yakın elde edildiğinden sistem doğrusal olarak kabul edilmiştir [110]. Kesinlik doğrulamasında 3 farklı konsantrasyonun her biri 4 tekrarlı çalışılmıştır ve elde edilen sonuçların standart sapmaları hesaplanmıştır [110]. Tüm standart sapma sonuçları %10'dan küçük elde edilmiştir [110]. Özgüllük doğrulamasında geliştirilen kitin 7 farklı patojene karşı çapraz reaktivite açısından test edilmesi yapılmıştır ve çalışma sonucunda geliştirilen kit hiçbir farklı patojenle çapraz reaktiviteye girmemiştir [110]. Çalışmada geliştirilen tanı kitinin özgül, kesin ve doğrusal olduğunu kanıtlanmıştır [110]. Literatürde başka bir çalışmada ise tek boyalı prob kullanılarak geliştirilen yeni CMV Real-Time PCR tanı kitinin doğrulama çalışması 159 örnek yapılmış ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması piyasada mevcut olan iki ticari kit ile yapılmıştır [111]. Doğrulama çalışmaları kapsamında doğrusallık, kesinlik ve duyarlılık parametreleri test edilmiştir [111]. Yeni geliştirilen tanı kitinin doğrusallık ölçüsü olan R^2 değeri 0,994, kesinlik ölçüsü varyasyon katsayısı değeri

%2,6 ve duyarlılık oranı %88 elde edilmiştir [111]. Tanı kiti, R^2 değeri 1'e oldukça yakın elde edildiğinden dolayı doğrusal ve varyasyon katsayısı %5 değerinin altında elde edildiğinden dolayı kesin bir sistem olarak elde edilmiştir [111]. Ancak duyarlılık oranı tanı kitlerinde hedef başarı kriteri %95'in altında kalmıştır. Çalışma sonucunda tanı kitinin duyarlılık değerinin ilerleyen dönemlerde daha geniş örneklem grubuyla yeniden çalışılması önerilmiştir [111]. Yapılan başka bir çalışmada ise CMV tanısı için geliştirilen yeni Real-Time PCR tanı kitinde primer tabanlı sinyal üretme yöntemi olan FLAG (Floresan Amplikon Üretimi) teknolojisi kullanılmıştır [113]. Geliştirilen yeni kitin doğrulama çalışmasını yapmak amacıyla referans olarak iki ticari tanı kiti kullanılmıştır [113]. Doğrulama çalışması sonucunda kitin doğrusallık ölçüsü R^2 değeri (0,96), duyarlılığı %99 ve özgüllüğü %95 elde edilmiştir [113]. Tanı kitinin duyarlılık ve özgüllük değerleri %95 hedef başarı kriteri sağlamış ve R^2 ölçüsü 1'e oldukça yakın olduğundan dolayı doğrusallığı kanıtlanmıştır [113]. Piyasada mevcut olan ticari CMV Real-Time PCR tanı kitinin doğrulamasının yapıldığı çalışmada 141 örnek kullanılmıştır ve çalışmada elde edilen sonuçlar kültür test yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır [115]. Real- Time PCR tanı kitinin sonuçları kültür test sonuçları ile %96 uyum göstermiştir. Kitin LoD değeri 200 kopya/ml, duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %98,2 olarak elde edilmiştir [115]. Sistemin duyarlılık ve özgüllük oranları %95 hedef başarı kriteri sağlamıştır [115]. Yapılan çalışmaya göre ticari tanı kiti CMV tanısı için hassas ve güvenilir bir sistem olarak kabul edilmiştir [115]. Başka bir çalışmada ise CMV tanısı için geliştirilen yeni tanı kitinde farklı bir PCR çeşidi olan Dijital PCR yöntemi kullanılmıştır ve bu yeni tanı kitinin doğrulama çalışması kapsamında doğrusallığı ve kesinliği test edilmiştir [116]. Çalışma sonucunda kitin doğrusal regresyon analizi sonucu doğrusallık ölçüsü R^2 değeri 0,99 ve kesinlik ölçüsü varyasyon katsayısı değeri %0,7 elde edilmiştir [116]. R^2 değeri 1'e oldukça yakın ve varyasyon katsayısı %5 değerinin oldukça altında elde edilerek yeni tanı kiti hedef başarı kriterlerini sağlamıştır [116]. Bu sonuçlara dayanılarak geliştirilen CMV Dijital PCR tanı kiti doğrusal ve kesin bir sistem olarak kabul edilmiştir [116]. Çalışmada gerekli koşulların sağlanamamasından dolayı duyarlılık ve özgüllük parametreleri test edilememiş ve bu parametrelerin ilerleyen dönemlerde test edilmesi önerilmiştir [116].

Literatürde CMV enfeksiyonu tanısında Real-Time PCR yöntemi ile antijen ve kültür test yöntemlerinin performanslarının karşılaştırıldığı birçok çalışma da mevcuttur. CMV enfeksiyonu tanısında Real-Time PCR yöntemi ile antijen test yönteminin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmada 1156 numune her iki test yöntemi ile çalışılmıştır [129]. Çalışma

sonucunda her iki test sonucu arasındaki uyum %82.2 olarak elde edilmiştir [129]. Bu sonucun %95 kriterinin altında kalmasının ana nedeni, antijen testlerinin aktif enfeksiyon başlangıcında yanlış negatif sonuç vermesi, PCR yönteminin ise enfeksiyonu ilk evrelerinde bile başarılı olarak tespit etmesi olarak belirtilmiştir [129]. Başka bir çalışmada ise CMV tanısı için Real-Time PCR tanı kiti ile *pp65* antijen testi karşılaştırılmıştır [120]. Çalışma sonucunda *pp65* antijen testinin duyarlılığı (%80,1), özgüllüğü %93 elde edilirken; Real-Time PCR yönteminin duyarlılığı %95, özgüllüğü %100 elde edilmiştir [120]. Duyarlılık ve özgüllük değerleri açısından Real-Time PCR tanı kiti %95 başarı kriterini sağlarken, antijen testi hedef başarı kriterinin altında kalmıştır [120]. Bu sonuca dayanılarak CMV tanısında Real- Time PCR yönteminin *pp65* antijen testi yöntemine göre daha hassas ve güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir [120]. Yapılan bir çalışmada ise CMV tanısı için DSÖ standartlarına göre standardize edilmiş kurum içi Real-Time PCR tanı testi referans sistem olarak kullanılarak, *pp65* antijen testinin duyarlılık ve özgüllük doğrulaması yapılmıştır [130]. Çalışma sonucunda CMV için *pp65* antijen testinin duyarlılığı (%67,4), özgüllüğü ise (%94,8) olarak elde edilmiştir [130]. Bu sonuçlar CMV tanısında PCR sistemlerinin elde ettiği duyarlılık ve özgüllük oranlarının oldukça altında kalmıştır [130]. Başka bir çalışmada ise CMV tanısında bir diğer PCR çeşidi olan Nested-PCR tanı kiti ile viral kültür test yöntemi hassasiyet açısından karşılaştırılmıştır [105]. Çalışma sonucunda Nested-PCR yöntemi ile CMV tanısı viral kültür yöntemine göre daha erken evrede tanılanmıştır [105]. Bu sonucun nedeni ise enfeksiyonun ilk evrelerinde yeteri kadar viral yük miktarı oluşmamasından dolayı varolan viral yük miktarının kültür testi için yetersiz olması ve bu yüzden kültür yönteminin hastalığın ilk evlerinde enfeksiyonu yanlış negatif tanılaması olarak belirtilmiştir.

Literatürde CMV tanısında antijen ve kültür testlerinin performanslarının karşılaştırıldığı çalışmalarda mevcuttur. CMV tanısında antijen ve kültür testlerini karşılaştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada 107 CMV pozitif örnek ile çalışılmıştır [123]. Kültür testi ile 56 örnek CMV pozitif olarak tanılanırken, antijen testi ile 97 örnek CMV pozitif olarak tanılanmıştır [123]. Bu sonuca dayanılarak CMV tanısında antijen testinin kültür testine göre daha güvenilir sonuç verdiği kabul edilmiştir [123]. CMV tanısında antijen testi ile kültür yönteminin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise 32 CMV pozitif hasta örneği kullanılmıştır [124]. Antijen testi ile 28 (%87,5) pozitif tanı elde edilirken, kültür testi ile 22 (%69) örnek pozitif olarak tanılanmıştır [124]. Çalışma sonucunda CMV tanısında antijen testinin kültür testine göre daha tutarlı sonuçlar verdiği görülmüştür [124].

CMV tanısında antijen ve kültür testlerinin duyarlılık ve özgüllük değerlerini karşılaştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada antijen testinin duyarlığı (%100), özgüllüğü (%99,6) elde edilirken; kültür testinin duyarlığı (%46), özgüllüğü (%100) elde edilmiştir [127]. Antijen testinin duyarlılık ve özgüllük değerleri % 95 başarı kriterini sağlarken; kültür testinin duyarlılığı %95 kriterinin oldukça altında elde edilmiştir [127]. Bu sonucun nedeni ise kültür yöntemi için yeterli viral yük örneğinin sağlanamaması olarak belirtilmiştir [127]. Başka bir çalışmada ise CMV tanısında Real-Time PCR, antijen ve kültür testlerinin duyarlılık ve özgüllük oranları karşılaştırılmıştır [125]. Yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri; PCR için sırasıyla (%99), (%84), antijen için (%48), (%99), kültür için (%38), (%100) elde edilmiştir [125]. Antijen ve kültür test yöntemleri için duyarlılık oranlarının %95 başarı kriterinin oldukça altında elde edilmesi hastalığın erken evresindeki yetersiz viral yük miktarı olarak gösterilmiş ve PCR yönteminin elde ettiği yüksek duyarlılık oranıyla hastalığın ilk evrelerinde bile başarılı sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır [125]. Ancak PCR testi ise özgüllük doğrulamasında %95 başarı kriterinin altında kalmıştır [125]. Bu durumun nedeni olarak test esnasında çapraz reaktivite veya kontaminasyon olabilmesi olarak gösterilmiştir [125]. Çalışma sonucunda CMV tanısında PCR yönteminin, antijen ve kültür yöntemlerine kıyasla daha güvenilir sonuçlar verdiği belirtilmiştir [125]

Literatürde CMV tanısında serolojik test yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda mevcuttur. Serolojik test çeşidi olan ELISA testinde hastada virüse karşı geliştirilmiş immünoglobülin G (IgG) veya immünoglobülin M (IgM) antikor titrelerin değişimine bakılarak tanı konulmaktadır [108].Yapılan bir çalışmada ELISA yöntemiyle CMV tanısında IgG ve IgM antikorlar titrelerinin güvenilir sonuç verme oranlarının karşılaştırılması yapılmıştır ve çalışma sonucunda IgG antikor titre sonucunun CMV tanısında daha güvenilir sonuç verdiği elde edilmiştir [108]. ELISA yöntemine benzeyen IgM antikor titre değişimini ölçen ELFA (Enzim Bağlı Floresan Testi) yöntemide serolojik testler arasındadır. CMV tanısında ELISA ve ELFA yönteminin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla 98 örnek kullanılarak yapılan bir çalışma sonucunda 90 (%91,83) örneğin sonuçları iki test yönteminde uyumlu elde edilmiştir ve iki testin CMV tanısında eşdeğer güvenilirlikte olduğu sonucuna ulaşılmıştır [112]. Bir diğer çalışmada ise ELISA yöntemi ile kültür yöntemi karşılaştırılmıştır [126].Çalışmada 35 CMV pozitif örneğin 31'i kültür testi ile pozitif tanılanırken, ELISA yöntemiyle 29'u pozitif tanılanmıştır. ELISA yönteminin, kültür yöntemine göre daha az pozitif tanı tespit etmesi hastalığın erken dönemlerinde yeterli antikor seviyesinin oluşmamasından dolayı olabileceği düşünülmüştür [126]. Çalışma

sonucunda CMV tanısında hastalığın erken dönemlerinde kültür yönteminin, ELISA yöntemine kıyasla daha güvenilir sonuçlar verdiği kabul edilmiştir [126]. Bağışıklığı baskılanmış hasta grupları için CMV tanısı ve takibi oldukça önemli olduğundan dolayı IgM ve IgG antikor titrelerinideki değişimi izleyen yeni bir immün monitörizasyon cihazının CMV tanısına uygunluğu 79 örnek ile çalışılmıştır [114]. Çalışma sonucunda CMV tanısında hassas viral yük tayini yapabilmesinden dolayı immün monitörizasyon cihazı CMV tanısı için uygun kabul edilmiştir [114].

CMV tanısında en çok tercih edilen test yöntemi olan Real-Time sistemi, güvenilir olması nedeniyle başka patojenlerin tayininde sık tercih edilmektedir. Bu kapsamda literatürdeki farklı patojenlerin Real-Time sistemi ile tespit edildiği çalışmalara bakıldığında Sars-CoV-2 tespitinde sık kullanılan bir test yöntemi olduğu görülmüştür. Sars-CoV-2 tanısında mevcut olan 3 farklı ticari PCR kitinin performanslarının karşılaştırıldığı bir çalışmada 3 tanı kitinin test sonuçları uyumlu ve analitik duyarlılık oranları %90 ve üzeri elde edilmiştir [98]. Çalışma sonucunda Sars-CoV-2 tanısında Real-Time PCR yönteminin güvenilir olduğu belirtilmiştir [98]. Başka bir çalışmada Sars-CoV-2 tanısında iki ticari tanı kiti performans karşılaştırılması yapılmıştır [100]. Ancak çalışma sonucunda analitik duyarlılık sonuçları oldukça farklı elde edilmiştir. Ticari 1 tanı kitinin analitik duyarlılığı %96,5 elde edilirken, diğer tanı kitinin duyarlılığı %75 olarak oldukça düşük elde edilmiştir [100]. Çalışma sonucunda ticari 2 tanı kitinin doğrulama çalışmalarının tekrar yapılması önerilmiştir [100]. Sars-CoV-2 tanısı için geliştirilen yeni Real-Time PCR sisteminin doğrulamasının yapıldığı çalışmada kesinlik, özgüllük, duyarlılık ve saptama sınırı değerleri test edilmiştir [118]. Yapılan analiz sonucunda geliştirilen Real-Time sistemi %100 duyarlılık ve özgüllük göstermiştir. Kesinlik ölçüsü varyasyon katsayı değeri 0,00975 ve saptama sınırı 100 kopya/ml olarak elde edilmiştir [118]. Geliştirilen tanı sistemi oldukça hassas, özgül ve kesin sonuçlar veren tanı sistemi olarak kabul edilmiştir [118]. Aynı anda 6 farklı herpes virüsü tespit edebilen Multipleks PCR sisteminin geliştirildiği çalışmada virüsler arası çapraz reaktivite gözlenmemiştir [95]. Geliştirilen sistemin duyarlılığı (%91,7), özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir [95]. Hepatit B virüs tanısı için de yeni Dupleks Real-Time PCR tanı kiti geliştirilmiştir ve kitin test sonuçları çalışmada referans olarak kullanılan iki ticari tanı kiti sonuçları ile karşılaştırılmıştır [107]. Çalışma sonucunda yeni geliştirilen tanı kiti referans sistemlerin sonuçları ile %100 uyumlu sonuçlar elde etmiştir [107]. Bu çalışma sonucunda geliştirilen yeni Dupleks Real-Time PCR sistemin Hepatit B virüs tanısında güvenilir bir yöntem olduğunu kanıtlanmıştır [107]. İnsan maymun

çiçeği virüsü tanısı için geliştirilen Real-Time PCR sisteminin doğrulama çalışması kapsamında sistemin duyarlılığı ve özgüllüğü test edilmiştir ve çalışma sonuçları referans ticari Real-Time PCR sistemi ile karşılaştırılmıştır [122]. Geliştirilen sistemin sonuçları referans sistem sonuçları ile %100 korelasyon göstermiş ve sistemin duyarlılığı, özgüllüğü %100 olarak elde edilmiştir [122]. Bir solunum yolu bakterisine özgü geliştirilen Real-Time PCR tanı kitinin doğrulama çalışması yapılırken ilk olarak testin performansını büyük ölçüde etkileyen hedefe özgü primer ve probların analizi yapılmıştır [117]. Çalışmada primer ve problar hedefe özgü tasarlanmıştır ve bu yapıların başka sekanslarla homoloji açısından analizi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), bağlanma esnasında ikincil yapı oluşturma olasılıklarının analizi ise IDT (Integrated DNA Technologies) veri tabanında yapılmıştır [117]. Yapılan analizler sonucunda tasarlanan primer ve probların özgül olduğu sonucuna varılmıştır. IDT veri tabanında yapılan analiz sonucunda da ikincil yapı oluşturma olasılıkları oldukça az çıktığı belirtilmiştir [117]. Geliştirilen sistemin doğrusallığı ve kesinliği analizi de yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda R^2 değeri (0,99), kesinlik değeri varyasyon katsayısı %0,64 elde edilmiştir [117]. Çalışma sonucunda solunum yolu bakterisine özgü Real-Time PCR sistemi doğrusal ve kesin sonuçlar veren bir sistem olarak kabul edilmiştir [117]. İnsan *plazmodium p*arazitlerine özgü tasarlanan Real-Time PCR sisteminin doğrulamasının yapıldığı çalışmada, geliştirilen sistemin test sonuçları bir diğer PCR sistemi olan Nested-PCR ile karşılaştırılmıştır [119]. Doğrulama çalışması kapsamında kitin özgüllüğü ve saptama sınırı test değilmiştir [119]. Geliştilen tanı sistemi ile Nested PCR sistemi karşılaştırıldığında; Real Time PCR sistemi ile %100 doğru sonuçlar elde edilirken, Nested PCR sistemi %96,43 doğru sonuç elde edilmiştir [119]. Sistemin özgüllüğü %100 ve saptama sınırı 199 kopya/ml olarak elde edilmiştir [119]. Çalışma sonuucunda insan *plazmodium* parazitleri tanısı için Real-Time PCR sisteminin Nested-PCR sistemine göre daha hassas sonuçlar verdiği belirtilmiştir [119]. Kolorektal kanseri tanısı invaziv ve zaman alıcı bir yöntem olmasından dolayı ticari Real-Time PCR tanı kitinin kolorektal kanser tanısında kullanıldığı çalışma sonucunda kitin tanısal duyarlılık oranı %96 olarak elde edilmiştir [35]. İnsan gastrointestinal sisteminde bozukluğa yol açan, gıdalar, içme sularından bulaşan norovirüslerin tanısında da Real-Time PCR tanı kitinin kullanıldığı çalışma sonucunda kitin tanısal duyarlılık oranı %96,6 olarak elde edilmiştir [65].

CMV PCR tanı kitlerinin geliştirilmesinde primer tasarımı kit performansını önemli ölçüde etkilediğinden dolayı önemli bir parametredir. Literatürde CMV'ye özgü primerlerin tasarımı için en iyi gen bölgesinin belirlenmesi amacıyla yapılan birçok optimizasyon

çalışması vardır. PCR yöntemi ile CMV tanısında virüs genomunda yer alan farklı bölgelere özgü primerler tasarlanmaktadır. Primerlerin özgüllüğü tanı sistemin özgüllüğü etkileyen önemli bir parametredir. CMV'ye özgü primer tasarımı için en iyi gen bölgesini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışma sonucunda CMV genomunda bulunan UL55, UL54 VE UL83 gen bölgelerine özgü yapılan primer çiftlerinin yüksek duyarlılıkta test sonuçları elde ettiği belirtilmiştir [104]. Başka bir çalışmada ise CMV tanısı için Real-Time PCR kitinde UL123 bölgesine özgü primer kullanılmış ve tasarlanan primerler %100 CMV' ye özgü elde edilmiştir [109]. CMV enfeksiyonu tanısında UL83 gen bölgesi tarafından kodlanan *pp65* proteini virüsün ana proteinidir ve enfeksiyonun erken döneminde çok fazla ekprese olması nedeniyle CMV tanısında sık kullanılmaktadır [107]. Literatürde yapılan bir çalışmada tanı kitinde CMV'ye özgü primer tasarımında *pp65* bölgesi korunmuş olması nedeniyle hedef alınmış ve bu bölgeye özgü tasarlanan primerlerin sayesinde %100 CMV'ye özgü tanı kiti geliştirilmiştir [92].

PCR deneyleri esnasındaki reaksiyon koşulları da tanı kitlerinin performanslarını önemli ölçüde etkilemektedir. Literatürde ticari bir Real-Time PCR tanı kitinin reaksiyon koşulları için optimum primer, $MgC1_2$ konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklığı değeri belirlemek amacıyla optimizasyon çalışması yapılmıştır [92]. Çalışma sonucunda optimum primer ve $MgC1_2$ konsantrasyonları sırasıyla (0,5 µM), (3 mM), ve bağlanma sıcaklığı optimum değeri ise 55 °C olarak elde edilmiştir [92]. PCR tanı kitlerinin performansını etkileyen diğer önemli bir etken ise internal kontrol genidir. İnternal kontrol genleri sayesinde PCR deneyleri esnasında inhibisyon kontrolü yapılır ve yanlış negatif, pozitif sonuçların önüne geçilir [131]. Literatürde yapılan bir çalışmaya bakıldığında Hepatit C virüsü tanısı için PCR deneylerinde internal kontrol geni kullanılmış ve internal kontrol geni sayesinde test hassasiyeti, internal kontrol kullanılmayan test sonuçlarına kıyasla %1-%6 arasında daha düşük elde edilmiştir [131]. Bu çalışma PCR tanı kitlerinde test doğruluğu ve güvenilirliği açısından internal kontrol geninin kullanılması gerektiği görüşünü belirtmektedir [131].

Literatürdeki yapılan çalışmalar sonucunda CMV tanısında Real-Time PCR yönteminin antijen, kültür ve ELISA yöntemlerine kıyasla oldukça yüksek performans karakterlerine sahip olduğu kanıtlanmaktadır. Bununla birlikte geliştirilen tanı kitlerinde optimizasyon deneyleri yapılması, internal kontrol geni kullanılması ve doğrulama çalışmaların yapılması tanı kitinin performans karakterlerini önemli ölçüde etkilemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada PCR deneyleri için dNTP, PCR buffer, primer, prob, $MgCl_2$, *Taq* polimeraz ve PCR distile su kullanılmıştır. Bu kimyasallar Tablo 3.1.'de listelenmiştir.

dNTP	Sigma Aldrich
PCR Buffer	Thermo Fisher Scientific
Primer	Metabion
Prob	Metabion
$MgCl_2$	Sigma Aldrich
Taq Polimeraz	Thermo Fisher Scientific
PCR Distile Su	Thermo Fisher Scientific

Tablo 3. 1. Kimyasallar

3.2. Yöntem

Bu çalışma amacı doğrultusunda oldukça uygun fiyatlı Denovo marka end-point özellikli PCR cihazı kullanılmıştır. PCR cihazlarında kullanılan probların çalışma prensibinde hem florofor hem de söndürücü boya içermesi nedeniyle 2 uçlu floresan boya kullanılırken, bu çalışmada end-point cihazla uyumlu sadece florofor boya içeren prob kullanılarak gerekli deneylerin yapılması ve sonuçların doğrulanması amaçlanmıştır.

3.2.1. Primer ve prob dizaynı

Hedefe özgü olarak tasarlanan primerler ve prob National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabında dizayn edilmiştir. Primer ve problar tasarlanırken CMV'e özgü korunmuş bir bölge olan *pp65* gen bölgesi kullanılmıştır. Tasarım yapılırken primer uzunluğunun 18-23 nt (nükleotit) aralığında olması ve içerdiği Guanin-Sitozin oranının %40-60 arasında tercih edilmiştir. Primerler tasarlanırken GGGG, CCCC gibi ardışık tekrarlardan ve ATAT gibi dinükleotit tekrarlarından kaçınılmıştır.Primerlerin 3' ucunda G, C, GC veya CG olmaması tercih edilmiştir. Hedefe özgül bağlanmayı arttırmak amacıyla

primerlerin 3'ucundaki son 5 bazında belli oranda GC içeriğe sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Primerlerin self complementarity skorunun en fazla 8, self 3' complementarity skorunun en fazla 3 olması tercih edilmiştir.

Primerlerin erime sıcaklıklarının 57-62°C aralığında olması ve ileri-geri primerlerin erime sıcaklıkları arasındaki farkının 3°C'den fazla olmaması tercih edilmiştir. Bu sıcaklık, Tm=2(AT) + 4(GC) formülü ile hesaplanmıştır [81].

Bağlanma sıcaklığı primerlerin tamamlayıcı oldukları bölgelere bağlanması için gereken sıcaklıktır ve primerlerin erime sıcaklıklarına göre belirlenmiştir.

Primer bağlanma sıcaklığı, Ta= 0,3*Tm(primer)+0,7*Tm(ürün)-14,9 formülasyonu kullanılarak belirlenmiştir [81].

Prob tasarımında da NCBI veritabanı kullanılmıştır. Tasarım yapılırken probun 5'ucunda Guanin bazı olmamasına dikkat edilmiştir. Prob uzunluğunun 18-27 nt aralığında, erime sıcaklığının 57-63°C aralığında, ardışık ve di-nükleotit tekrarlarının en fazla 5 olması tercih edilmiştir. Self complementarity ve self 3'complementarity skorunun en fazla 12 olması tercih edilmiştir.

Reaksiyon basamaklarının sıcaklık değerleri, reaksiyon başlangıcında 95°C'de 10 dakika, denatürasyon basamağında 94°C'de 15 saniye, primer bağlanma basamağında 60°C'de 30 saniye, uzatma aşamasında ise *Taq* polimeraz enziminin optimum sıcaklık değeri olan 72°C'de 45 saniyede olacak şekilde PCR amfikasyon reaksiyonları toplamda 40 döngüde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri miktarları ise ileri ve geri primerler (0,5 µl), prob (0,5 µl), *Taq* polimeraz (1,0 µl),), dNTP (0,5 µl), PCR buffer (2,5 µl), PCR distile su (17,5 µl), CMV örneği (1,0 µl), ve $MgC1_2$ (1,5 µl) olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Verilerin Analizi

Çalışmadan elde edilen deney sonuçları Microsoft Excel programı kullanılarak analiz edilmiştir. Deney sonuçlarına ait standart sapma, varyasyon katsayısı ve ortalama değerleri Excel fonksiyonları kullanılarak hesaplanmıştır. Verilerin kalibrasyon grafikleri ve bu grafiklerin denklemleri Microsoft Excel fonksiyonları ile elde edilmiştir. Microsoft Excel

programında elde edilen sonuçlar ile aşağıdaki doğrulama parametrelerinin analizi yapılmıştır.

3.2.3. Cut-off skoru

Çalışmada cut-off skoru belirlemek için deneylerin yapıldığı Denovo laboratuvarından hazır olarak temin edilen, referans sistem ile kalitatif olarak negatif tanısı konulan 21 numune ile çalışılmıştır. Bu örneklerin geliştirilen tek floroforlu kit ile end-point cihazda PCR deneyleri yapılmıştır. Deneyler sonucunda floresan okuma değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen floresan okuma değerlerin ortalaması ve standart sapması Microsoft Excel fonksiyonları ile elde edilmiştir. Hesaplanan ortalama değerin üstüne 2 standart sapma eklenerek cut-off skoru elde edilmiştir. Referans sistem ile pozitif tanısı konulan 27 hazır numune, geliştirilen prototip sistem ile floresan okuma değerleri kaydedilmiştir. Prototip sistemden elde edilen floresan değerlerin referans sistemden elde edilen değerlere göre yalancı pozitif ve yalancı negatif analizine cut-off skoru bakılarak karar verilmiştir. Cut-off skoruna göre yapılan analiz sonucu hedef başarı kriteri %95 ve üzeri olarak hedeflenmiştir.

3.2.4. Analitik duyarlılık

Çalışmada geliştirilen sistemin analitik duyarlılığını belirlemek amacıyla LoD hesaplaması 10 farklı numune ile yapılmıştır. Numunelerin viral yükleri seçilirken geliştirilen sistemin yeni olmasından dolayı fazla hassas ölçüm yapamayacağı öngörüldüğünden çok düşük viral yük miktarları ve daha yüksek viral yük miktarları ise anlamsız sonuçlar vereceğinden dolayı tercih edilmemiştir. Deneylerin yapıldığı Denovo laboratuvarın önerileri doğrultusunda prototip sistemde, viral yük miktarları 244, 257, 264, 266, 271, 274, 278, 280, 284 ve 297 kopya/ml olan 10 numunenin her biri 12 kez tekrarlı olarak çalışılmıştır. Viral yüklerden elde edilen cevap sayıları her viral yük miktarı için kaydedilmiştir ve cevaplama yüzdesi hesaplanmıştır. Tekrarlı olarak çalışılan viral numunelerde %95'inde doğru olarak tanılanan en düşük konsantrasyonu bulmak için viral yüklere karşı cevap yüzdelerin grafiği Microsoft Excel fonksiyonları kullanılarak çizilmiştir. Probit analizi ile LoD hesaplamasında probit tablosu kullanılarak cevaplama yüzdelerine karşılık gelen probit değerleri belirlenmiştir ve viral yüklere karşı denk gelen probitlerin grafiği Microsoft Excel fonksiyonları kullanılarak çizilmiştir. Elde edilen grafiğin denkleminden LoD hesaplaması yapılmıştır.

3.2.5. Analitik özgüllük

Çalışmada analitik özgüllük test edilmesi için geliştirilen kit, referans sistem ile kalitatif olarak negatif tanısı almış viral yük miktarları aynı olan 18 farklı türde patojene karşı çapraz reaksiyon açısından test edilmiştir. 18 farkı patojenin aile, cins ve tür bilgileri Ek 1'de gösterilmiştir [134]. Geliştirilen tanı kitinde bu patojenler için PCR deneyleri 12 tekrarlı olarak yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen floresan yoğunluk okuma değerleri kaydedilmiştir. Kaydedilen değerlerin pozitif ve negatif analizi elde edilen cut-off değerine göre analiz edilerek belirlenmiştir. Bu doğrultuda geliştirilen kitin başka patojenlerle reaksiyona girmesi durumunda yanlış pozitif sonuç elde edilip veya edilmeyeceğinin analizi yapılmıştır. Hedeflenen başarı kriteri analitik özgüllük oranının %95 ve üzeri olmasıdır.

3.2.6. Doğrusal aralık

Bu çalışmada prototip sistemin doğrusallığını test etmek amacıyla viral yük miktarı 1150 kopya/ml olan standart numune 5 kez %10 oranında dilüye edilmiştir. Dilüsyon sonucunda viral yükleri 575, 690, 805, 920, 1035 ve 1150 kopya/ml olan numuneler kullanılmıştır. Bu numunelerin PCR deneyleri prototip sistem ile yapılmıştır ve elde edilen floresan yoğunluk okuma değerleri kaydedilmiştir. Prototip sistem ile elde edilen okuma değerleri ile referans sistem ile kantitatif olarak belirlenen viral yük arasındaki ilişkiyi analiz etmek amacıyla Microsoft Excel fonksiyonu kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Elde edilen grafik ve grafiğin denklemi analiz edilerek doğrusal aralık test edilmiştir.

3.2.7. Kesinlik

Geliştirilen prototip sistemin kesinliğini belirlemek amacıyla Denovo laboratuvarından temin edilen viral yük miktarı 690 kopya/ml hazır numune kullanılmıştır. Bu numune prototip sistem ile 16 kez tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deneyler sonucunda her tekrarın floresan yoğunluk okuma değerleri kaydedilmiştir. Bu değerlerin denk geldiği kantitatif viral yük miktarlarını belirlemek amacıyla doğrusal aralık belirlenmesi çizilen grafiğin denklemi kullanılmıştır. Hesaplanan viral yüklerin standart sapması ve ortalaması Excel fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Kesinlik doğrulama çalışmasında varyasyon katsayısı değeri kullanılmaktadır. Bu doğrultuda standart sapma ve ortama değeri

kullanılarak varyasyon katsayı değeri Excel fonksiyonu kullanılarak hesaplanmıştır. Hedeflenen başarı kriteri varyasyon katsayısının %5 ve altında olmasıdır.

3.2.8. Tanısal duyarlılık ve tanısal özgüllük

Bu çalışmada geliştirilen sistemin tanısal duyarlılık ve tanısal özgüllük doğrulama çalışması kapsamında Denovo laboratuvarı tarafından temin edilen referans sistem ile kalitatif olarak tanılanan 21 negatif, 27 pozitif hazır numune kullanılmıştır. Tanısal özgüllük belirlenmesi amacıyla 21 negatif numune geliştirilen prototip sistem ile çalışılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen floresans okuma yoğunlukları kaydedilmiştir. Bu sonuçların negatif-pozitif ayrımı cut-off skoru ile karşılaştırılarak elde edilmiştir. Prototip sistemde yapılan deneyler sonucunda elde edilen negatif sonuçların sayısı, referans sistem ile elde edilen negatif sonuçların sayısına oranlanmasıyla tanısal özgüllük değeri hesaplanmıştır. Tanısal duyarlılık belirlenmesi amacıyla 27 pozitif hazır numune prototip sistem ile çalışılmıştır. PCR deneyleri sonucunda elde edilen floresan okuma değerleri kaydedilmiştir. Bu sonuçların pozitif-negatif ayrımı cut-off skoru ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Pozitif olarak tespit edilen numunelerin floresan okuma değerlerinin denk geldiği viral yük hesaplanmasında doğrusallık analizinde çizilen grafiğin denklemi kullanılmıştır. Denklemde y değeri yerine floresans okuma değeri konularak x değeri olan viral yük miktarı bulunmuştur. Deneyler sonucunda tespit edilen pozitif numunelerin sayısın, referans sistem ile elde edilen pozitif sonuçların sayısına oranlanmasıyla tanısal duyarlılık değeri saptanmıştır. Tanısal duyarlılık ve tanısal özgüllük için hedeflenen başarı kriteri %95 ve üzeri olmasıdır. Referans sistem ile tanılanan pozitif numunelerin viral yük miktarları ve prototip sistem ile tespit edilen pozitif numunelerin viral yük miktarları kullanılarak Microsoft Excel fonksiyonları ile grafik çizilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Primerler ve Prob

Primer tasarımı NCBI veritabanında CMV'ye özgü korunmuş bir bölge olan *pp65* bölgesine göre tasarlanmıştır. Tasarlanan ileri primerin uzunluğu 20 nt, erime sıcaklığı 59 °C, Guanin-Sitozin oranı %55, self complementarity skoru 2, self 3' complementarity skoru 0; geri primerin uzunluğu 20 nt, erime sıcaklığı 59°C Guanin-Sitozin oranı %60, self complementarity skoru 3, self 3' complementarity skoru 0'dır. Tasarlanan ileri ve primerlerin nükleotit dağılımı Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

İleri Primer	(5'-TCACCAGCCAGTATCGCATC-3')
Geri Primer	(5'-GAATCCTCGTCGGTGTCCTC-3')
FAM Prob	(5'-TGACACGCGGCCGCCTTAATAGCG-3')

Tablo 4. 1. İleri, geri primerler ve prob tasarımları

Prob tasarımında NCBI veri tabanı kullanılmıştır ve Tablo 4.1'de gösterilmişti. Tasarlanan probun uzunluğu 24 nt Guanin-Sitozin oranı %62 olarak elde edilmiştir. Probun, self complementarity skoru 5, self 3' complementarity skoru ise 3 elde edilmiştir.

4.2. Cut-off Skoru

Çalışmada referans sistem ile kalitatif olarak tanılanmış 21 negatif numune, 27 pozitif hazır numune kullanılmıştır. Geliştirilen tek floroforlu kit ile 21 negatif numunenin PCR deneyleri yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen floresan yoğunluk okuma değerleri kaydedilmiştir ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Bu değerlerin ortalaması ve standart sapması Excel fonksiyonları ile alınmıştır. Negatif numunelerin floresan okuma değerleri ortalaması (34,43), standart sapması 0, 886 elde edilmiştir. Cut-off skoru ortalama +2 standart sapma formülü ile %95 güven aralığında hesaplanmıştır. Bu formül sonucunda cut-off değeri 36,198 elde edilmiştir (Tablo 4.4.).

Prototip sistemde elde edilen deneyler sonucu floresan okuma değerleri kaydedilen 21 negatif ve 27 pozitif numunenin referans sisteme göre doğru pozitif-negatif, yalancı pozitif-

negatif karşılaştırması cut-off skoruna göre analiz edilmiştir. Bu analize göre 21 negatif numuneden 20'si prototip sistemde de negatif olarak tanılanırken, 1 negatif numune prototip sistemde yalancı pozitif olarak tanılamıştır (Tablo 4.2.). 27 pozitif numuneden ise 26'sı prototip sistemde de pozitif olarak tanılanırken, 1 pozitif numune yalancı negatif olarak tanılanmıştır (Tablo 4.3.). Tanı kitlerinde doğrulama kriterlerinde %95 ve üzeri başarılı olarak kabul edilmektedir. Referans sistemde tanılanan 48 numuneden 46'sı prototip sistemde doğru tanılanarak %95,83 (46/48*100) olarak sonuç elde edilmiştir.

Örnek	Referans Sistem Kalitatif Tanı	Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	
N01	-	35,05	
N02	-	35,07	
N03	-	35,01	
N04	-	33,83	
N05	-	33,86	
N06	-	33,89	
N07	-	35,10	
N08	-	33,45	
N09	-	36,98	Yalancı Pozitif
N10	-	33,48	
N11	-	33,53	
N12	-	34,28	
N13	-	33,63	
N14	-	34,96	
N15	-	33,66	
N16	-	35,15	
N17	-	33,69	
N18	-	34,93	
N19	-	33,71	
N20	-	35,19	
N21	-	34,52	
	Ortalama	34,43	
	Standart Sapma	0,886	

Tablo 4. 2.Negatif numunelerin floresan yoğunluk okuma değerleri.

Örnek	Referans Sistem Kalitatif Tanı	Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları
P01	+	34,76 Yalancı Negatif
P02	+	36,29
P03	+	36,44
P04	+	36,23
P05	+	36,58
P06	+	41,31
P07	+	44,66
P08	+	37,97
P09	+	40,65
P10	+	40,99
P11	+	48,35
P12	+	49,03
P13	+	48,35
P14	+	49,35
P15	+	45,34
P16	+	49,03
P17	+	49,35
P18	+	56,07
P19	+	55,06
P20	+	55,72
P21	+	54,71
P22	+	59,74
P23	+	65,78
P24	+	71,47
P25	+	62,12
P26	+	49,08
P27	+	49,23
	Ortalama	48,28
	Standart Sapma	9,63

Tablo 4. 3. Pozitif numunelerin floresan yoğunluk okuma değerleri.

Negatif Örneklerin Ortalaması	34,43
Negatif Örneklerin Standart Sapması	0,886
Cut-off Skoru (Ortalama +2 Standart Sapma)	36,198

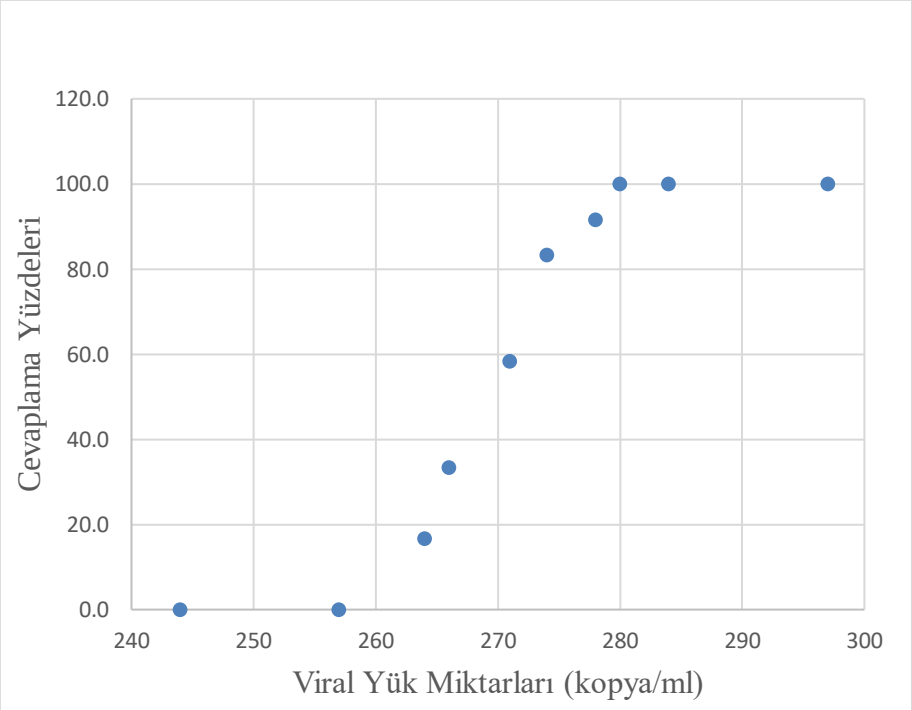
Tablo 4. 4. Cut-off skoru hesaplanması

4.3. Limit of Detection

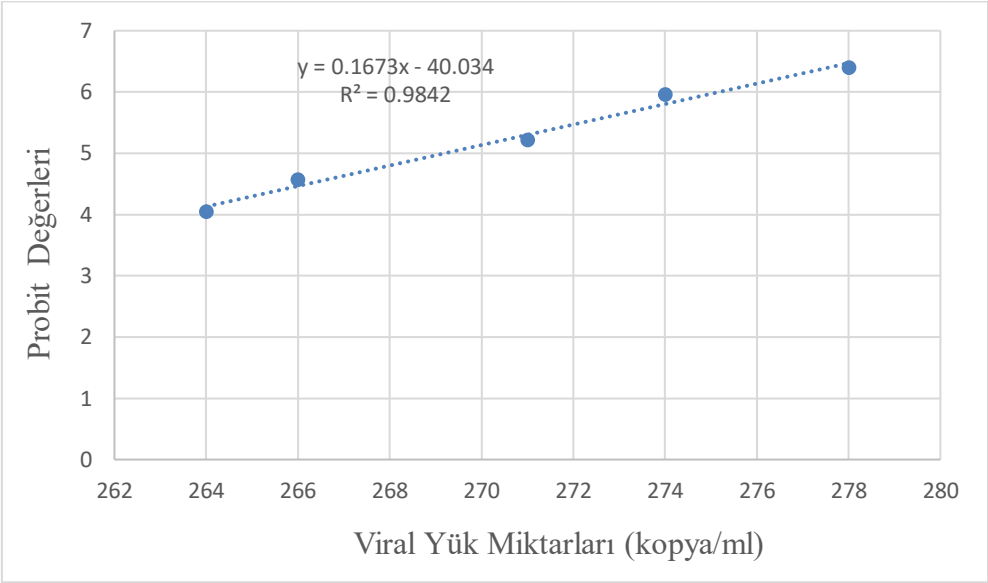
Geliştirilen kitin analitik duyarlılığı belirlenmesi amacıyla tekrarlı olarak çalışılan numunelerin %95'inde en düşük saptanan konsantrasyon miktarı olan LoD hesaplaması probit analizi ile Microsoft Excel fonksiyonları kullanılarak bulunmuştur. Bu doğrultuda viral yük miktarları farklı 10 numunenin her biri tekrarlı olarak 12 kez çalışılmıştır (Tablo 4.5.). Viral yükleri 297, 284 ve 280 kopya/ml olan numunelerin her birinin 12 tekrarı sonucunda hepsinde yanıt elde edilmiştir (Tablo 4.5.). Viral yükleri 257 ve 244 kopya/ml olan numunelerin 12 tekrarı sonucunda hiçbirinde yanıt elde edilmiştir (Tablo 4.5.). Viral yükleri 264 kopya/ml ile 278 kopya/ml arasında değişen numunelerde ise değişik cevap yüzdeleri elde edilmiştir (Tablo 4.5.). Tüm viral yüklerin 12 tekrar sonucu floresan yoğunluk okumaları Ek 2'de verilmiştir. LoD hesaplaması yapmak amacıyla viral yüklere karşı gelen cevaplama yüzdelerin grafiği Microsoft Excel fonksiyonları kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.1.). Ancak %100 ve %0 cevaplama yüzdeleri grafiğin doğrusal yayılımını engellediğinden dolayı grafiğin eğrisi doğrusal elde edilmemiştir. Bu yüzden doğrusal olmayan eğriyi doğrusal eğriye dönüştürmek amacıyla probit analizi uygulanmıştır. Bu analiz yöntemi ile doğrusal olmayan eğriyi doğrusal eğriye dönüşümü Finney tarafından geliştirilen probit dönüşümü tablosu kullanılarak yapılmıştır (Tablo 4.6.) [133]. Bu doğrultuda çalışmada viral yüklere karşı gelen cevaplama yüzdelerin probit tablosunda denk gelen değerleri kullanılarak bir grafik çizilmiştir ve bu grafik çizilirken %100 ve %0 cevaplama yüzdeleri kullanılmamıştır (Şekil 4.2.). Grafiğin denklemi ($y=0,1673x-40,034$), R^2 değeri 0,9842 olarak elde edilmiştir. Regresyon analizi sonucu elde edilen R^2 değeri 1'e oldukça yakın elde edildiğinden dolayı grafiğin eğrisi doğrusal olarak kabul edilmiştir. Prototip sistemin tekrarlı çalışmalarda %95 oranla en düşük yanıt verdiği konsantrasyon miktarını bulmak amacıyla probit tablosunda %95'e denk gelen değer bulunmuştur ve bu değer 6,64'tür (Tablo 4.6.). Grafik denkleminde y yerine 6,64 yazıldığında elde edilen x değeri en düşük konsantrasyon miktarı olan 279 kopya/ml elde edilmiştir (Tablo 4.7.). Bu değer prototip sistemin LoD değeridir.

Viral yük(kopya/ml)	Numune cevapları	Toplam tekrar sayısı	Cevaplar (%)	Probit
297	12	12	100,0	
284	12	12	100,0	
280	12	12	100,0	
278	11	12	91,7	6,39
274	10	12	83,3	5,96
271	7	12	58,3	5,21
266	4	12	33,3	4,57
264	2	12	16,7	4,04
257	0	12	0,0	
244	0	12	0,0	

Tablo 4. 5. Prototip sistem cevaplama oranları



Şekil 4. 1. Viral yük miktarlarına denk gelen floresan yoğunluk okuma değerleri.



Şekil 4. 2.Viral yük miktarlarına denk gelen probit değerleri.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,5	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,8	4,82	4,85	4,87	4,9	4,92	4,95	4,97
50	5	5,03	5,05	5,08	5,1	5,13	5,15	5,18	5,2	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,5
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

Tablo 4. 6. Probit değerleri [133].

6,64	probit
279 kopya/ml	LoD

Tablo 4. 7. Probit ve LoD değerleri

4.4. Analitik Özgüllük

Çalışmada referans sistem ile kalitatif olarak negatif tanısı almış viral yük miktarı aynı olan 18 farklı türde patojen kullanılmıştır ve Tablo 4.8.'da gösterilmiştir. Bu patojenlerin geliştirilen tanı kitinde PCR deneyleri 12 tekrarlı yapılmıştır ve 12 tekrar sonuçları Ek 3'de verilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen floresan yoğunluk okuma değerleri kaydedilmiştir (Tablo 4.8.). Elde edilen değerlerin pozitif ve negatif sonuç analizi cut-off skoruna göre karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

Cut-off skoru analizi sonucunda referans sistem ile negatif tanısı almış 18 farklı tür içeren numune, prototip sistem ile tanılandığında da tüm deney sonuçları negatif olarak elde edilmiştir (Tablo 4.8.). Geliştilen tanı kiti %100 başarı elde etmiştir. Tanı testlerinde başarı kriteri %95 ve üzeri hedefini prototip sistem sağlamıştır.

Örnek	Referans Sistem Kalitatif Tanı	Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
Herpes Simpleks Virüs-1 (HSV1)	-	32,94	-
Herpes Simpleks Virüs-2 (HSV2)	-	34,22	-
Ebstein-Barr-Virüs (EBV)	-	34,28	-
Clostridium Tetani (CT)	-	33,07	-
İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü-1 (HIV1)	-	34,43	-
Hepatit A Virüsü (HAV)	-	33,33	-
Hepatit C Virüsü (HCV)	-	34,86	-
Escherichia coli (E. Coli)	-	34,62	-
Mikobakteri Tüberküloz (MT)	-	33,74	-
İnsan Papillomavirüsü-16 (HPV16)	-	34,7	-
Tork Teno Virüsü (TTV)	-	33,79	-
İnsan Herpes Virüsü-8 (HHV8)	-	34,83	-
İnsan Herpes Virüsü-6 (HHV6)	-	33,86	-
Helikobakter Pilori (H. Pylori)	-	34,85	-
Brucella	-	33,94	-
Metisiline Direçli Staphylococcus (MRSA)	-	34,92	-
Hepatit B Virüs (HBV)	-	33,99	-
TOXO	-	34,09	-
	Ortalama	34,13666667	
	Standart sapma	0,614903149	

Tablo 4. 8.Farklı patojenlerin floresan yoğunluk okuma sonuçları.

4.5. Doğrusal Aralık

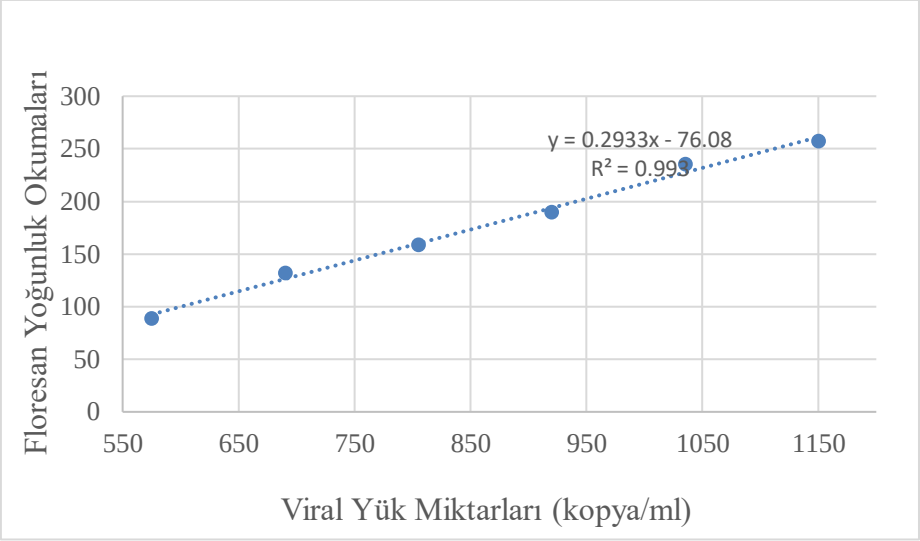
Geliştirilen prototip sistemin viral yük konsantrasyonlarına karşı verdiği floresans okuma değerlerini doğrusal bir aralıkta olacak şekilde vermesi istenilmektedir. Prototip sistemin doğrusal aralığını test etmek amacıyla viral yük miktarı 1150 kopya/ml olan standart örnek ve bu örneğin %10 oranında 5 kez dilüye edilmesiyle elde edilen 5 numune kullanılmıştır ve Tablo 4.9.'de gösterilmiştir. Bu numunelerin PCR deneyleri prototip sistem ile de yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen floresan okuma değerleri kaydedilmiştir (Tablo 4.9.).

Kantitatif viral yük konsantrasyonları ve floresan yoğunluk okuma değerleri arasındaki doğrusallık analizi yapmak amacıyla Microsoft Excel fonksiyonları kullanılarak grafik çizilmiştir ve Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Elde edilen grafiğin denklemi ve R^2 değeri kullanılarak analiz yapılmıştır.

Grafiğin denklemi (y=0,2933-76,08), R^2 değeri 0,993 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Grafik doğrusal bir eğri göstermiştir (Şekil 4.3.). R^2 değeri 1'e oldukça yakın elde edildiğinden de dolayı eğrinin doğrusallığı kanıtlanmıştır.

Numuneler	Referans Sistem Kantitatif Viral Yük Sonuçları (kopya/ml)	Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okuma Sonuçları
Standart 1	1150	257,01
Standart 2	1035	235,03
Standart 3	920	189,71
Standart 4	805	158,53
Standart 5	690	132,08
Standart 6	575	88,92

Tablo 4. 9. Standart numunelerin floresan yoğunluk okuma sonuçları



Şekil 4. 3. Viral yük miktarlarına denk gelen floresan yoğunluk değerleri

4.6. Kesinlik

Kesinlik doğrulaması amacıyla referans sistem ile viral yükü 690 kopya/ml olarak belirlenmiş numune kullanılmıştır. Bu numune prototip sistem kullanılarak 16 kez tekrarlı olarak çalışılmıştır. Prototip sistem ile gerçekleştirilen PCR deneyleri sonucunda floresan okuma değerleri kaydedilmiştir ve Tablo 4.10.'de gösterilmiştir. Her bir floresan okuma değerlerinin eşit olduğu viral yük miktarını hesaplamak amacıyla doğrusallık analizinde çizilen grafik denklemi (y=0,2933x-76,08) kullanılmıştır. Denklemde y değeri yerine viral yük miktarı yazılarak x değeri olan viral yük miktarı 16 floresan okuma değeri için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Elde edilen viral yüklerin standart sapması ve ortalaması Excel fonksiyonu

kullanılarak hesaplanmıştır. Viral yüklerin standart sapması (21,51), ortalaması 688,68 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.11). Varyasyon katsayısı hesaplamak amacıyla elde edilen standart sapmanın ortalamaya oranı yüzdelik değeri (standart sapma/ortalama*100) hesaplanmıştır. Bu hesaplama sonucunda varyasyon katsayısı %3,12 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.11.). Tanı testlerinde varyasyon katsayısı başarı kriteri %5 ve altında hedefini prototip sistem sağlamıştır.

Örnek	690 kopya/ml İçin Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kantitatif Tanı Viral Yük Miktarları (kopya/ml)
Standard 5 R01	118,61	664
Standard 5 R02	137,72	729
Standard 5 R03	122,67	678
Standard 5 R04	129,75	702
Standard 5 R05	124,9	685
Standard 5 R06	127,54	694
Standard 5 R07	125,2	686
Standard 5 R08	125,93	689
Standard 5 R09	135,87	723
Standard 5 R10	118,16	662
Standard 5 R11	132,31	711
Standard 5 R12	112,84	644
Standard 5 R13	127,25	693
Standard 5 R14	124,69	685
Standard 5 R15	125,93	689
Standard 5 R16	125,2	686
Ortalama	125,91	688,68
Standart Sapma	6,31	21,51

Tablo 4. 10. Standart numunenin prototip sistem ile viral yük sonuçları

	Tekrar sayısı	Standart Sapma	Ortalama	Varyasyon katsayısı (%)
Toplam varyans	16	21,51	688,68	3,12

Tablo 4. 11. Varyasyon katsayısı değeri hesaplaması.

4.7. Tanısal Duyarlılık ve Tanısal Özgüllük

Bu çalışmada geliştirilen prototip sistemin tanısal özgüllük ve duyarlılık doğrulama çalışmaları kapsamında referans sistem ile tespit edilmiş 21 negatif numune, 27 pozitif numune kullanılmıştır. Tanısal özgüllük belirlenmesi amacıyla negatif numunelerin PCR deneyleri prototip sistem ile yapılmış ve deneyler sonucunda elde edilen floresan okuma değerleri kaydedilmiştir ve Tablo 4.12.'de gösterilmiştir. Bu değerlerin cut off skoru ile karşılaştırılması sonucunda 20 numune negatif, 1 numune yanlış pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.12.). Prototip sistem ile tespit edilen 20 negatif numunenin, referans sistem ile tespit edilen 21 numune sayısına oranın yüzdelik hesaplanması yapılmıştır. Bu hesap sonucunda tanısal özgüllük %95,2 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.14.). Tanı testlerinde tanısal özgüllük oranı %95 ve üzeri başarı kriteri olarak kabul edildiğinden dolayı sistemin tanısal özgüllüğü başarılı olarak kabul edilmiştir.

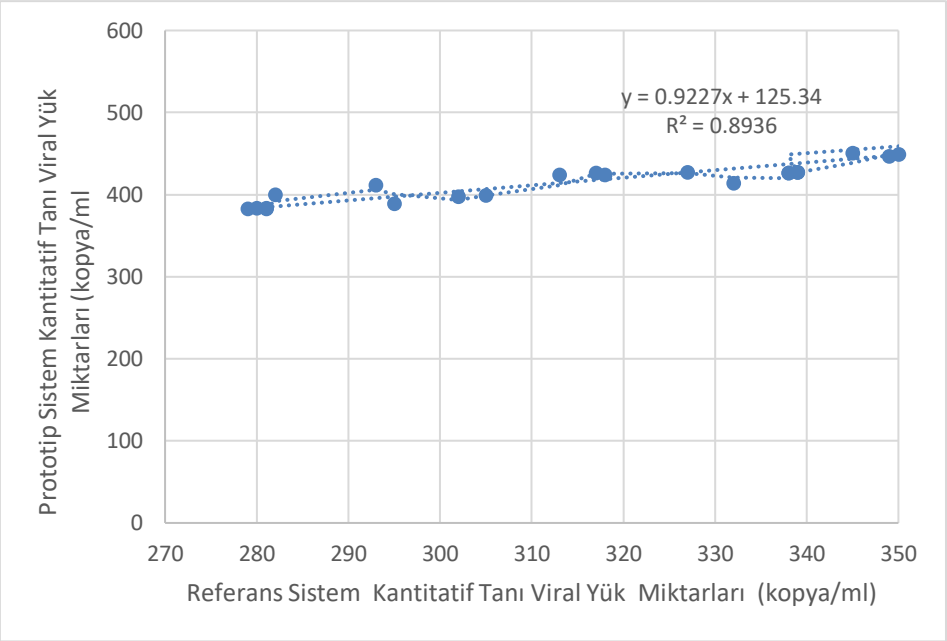
Tanısal duyarlılığın belirlenmesi amacıyla referans sistem ile tanılanan 27 pozitif numunenin prototip sistem ile de PCR deneyleri yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen floresan okuma değerleri kaydedilmiştir. Bu değerlerin cut-off skoru karşılaştırılması durumunda 26 numune pozitif, 1 numune yanlış negatif olarak tanılanmıştır (Tablo 4.13.). Prototip sistem ile tanılan 26 pozitif numune sayısının, referans sistem ile elde tanılan 27 pozitif numune sayısına oranının yüzdelik hesaplaması yapılmıştır. Bu hesap sonucunda tanısal duyarlılık oranı 96,3 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.14.) Tanı testlerinde tanısal duyarlılık oranı %95 ve üzeri başarılı olarak kabul edildiğinden dolayın sistemin tanısal duyarlılığı başarılı olarak elde edilmiştir. Prototip sistem ile pozitif ile tespit edilen numunelerin kantitatif viral yük hesaplaması yapılmıştır. Hesaplama yapılırken doğrusallık analizinde elde edilen grafiğin denklemi ($y=0,2933x-76,08$) kullanılmıştır. Denklemde y değeri yerine floresan okuma değerleri yazılıp x değeri olan viral yük miktarları 26 numune içinde hesaplanmıştır. Referans sistem ile elde edilen 26 pozitif numunenin viral yük miktarı ve prototip sistem ile tanılan 26 pozitif numunenin viral yük miktarları kullanılarak grafik çizilmiştir ve Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Grafiğin denklemi ($y=0,9227x+125,34$), R^2 değeri 0,8936 elde edilmiştir. Elde edilen grafiğin R^2 değeri 1'e çok yakın elde edilmemiştir. Bu sonuç prototip sistem ile referans sistem sonuçlarının aynı viral yükler için eşit olmadığınıda gsötermektedir.

Örnek	Referans Sistem Kalitatif Tanı	Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kantitatif Tanı Viral Yük Miktarları (kopya/ml)
N01	-	35,05	-
N02	-	35,07	-
N03	-	35,01	-
N04	-	33,83	-
N05	-	33,86	-
N06	-	33,89	-
N07	-	35,10	-
N08	-	33,45	-
N09	-	36,98	Yalancı Pozitif
N10	-	33,48	-
N11	-	33,53	-
N12	-	34,28	-
N13	-	33,63	-
N14	-	34,96	-
N15	-	33,66	-
N16	-	35,15	-
N17	-	33,69	-
N18	-	34,93	-
N19	-	33,71	-
N20	-	35,19	-
N21	-	34,52	-
Ortalama		34,43	
Standart Sapma		0,886	

Tablo 4. 12. Negatif numunelerin floresan yoğunluk okuma değerleri.

Örnek	Referans Sistem Kalitatif Tanı	Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kantitatif Tanı Viral Yük Miktarları (kopya/ml)
P01	265	34,76	Yalancı Negatif
P02	279	36,29	383
P03	280	36,44	384
P04	281	36,23	383
P05	281	36,58	384
P06	282	41,31	400
P07	293	44,66	412
P08	295	37,97	389
P09	302	40,65	398
P10	305	40,99	399
P11	313	48,35	424
P12	317	49,03	427
P13	318	48,35	424
P14	327	49,35	428
P15	332	45,34	414
P16	338	49,03	427
P17	339	49,35	428
P18	345	56,07	451
P19	349	55,06	447
P20	350	55,72	449
P21	358	54,71	446
P22	368	59,74	463
P23	372	65,78	484
P24	381	71,47	503
P25	384	62,12	471
P26	338	49,08	427
P27	339	49,23	427
Ortalama	323,37	48,28	426
Standart Sapma	34,33	9,63	32,14

Tablo 4. 13. Pozitif numunelerin floresan yoğunluk okumaları ve viral yük miktarları.



Şekil 4. 4. Viral yük miktarlarına karşı denk gelen prototip sistem viral yük miktarları.

Tanısal Özgüllük	95,2
Tanısal Duyarlılık	96,3

Tablo 4. 14. Tanısal özgüllük ve duyarlılık değerleri.

5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Dünya genelinde oldukça yaygın olarak görülen CMV yetişkinlik döneminde bireylerin yaklaşık %50 ile %80'i sitomegalovirüs enfeksiyonunu geçirmektedir [12, 25]. Türkiye'de ise yetişkinlik dönemiyle birlikte yaklaşık %90 seropozitiflik görülmektedir [30]. Dünya da ve ülkemiz de bu denli yaygın ve konjenital, bağışıklığı baskılanmış konaklarda ciddi bozukluklara yol açan virüsün tanı yöntemleri serolojik, kültür ve moleküler testler yer almaktadır [79, 80, 90]. Literatürde yapılan çalışmalar CMV tanısında serolojik ve kültür testlerin moleküler testlere göre özgüllük ve duyarlılık değerlerin düşük olduğunu; moleküler test çeşidi olan Real-Time PCR yöntemin ise yüksek performansı nedeniyle CMV tanısında altın standart olduğunu desteklemektedir [76, 81]. Ancak Real-Time PCR cihazları çok pahalı sistemler olması nedeniyle her hastane veya tanı merkezi bu cihazlara kolaylıkla ulaşabilmemekle birlikte bu cihaza sahip olan yerler ise tanı testini çok yüksek fiyatlara topluma sunmalarından dolayı toplum bu tanı kitine ulaşamamaktadır. Bu doğrultuda tez kapsamında oldukça düşük fiyatlı bir cihaz olan end-point özellikli Denovo marka cihazda çalışan tek floroforlu uygun fiyatlı tanı kiti geliştirmek ve doğrulama çalışması yapmak amaçlanmıştır. Geliştirilen tanı kitinin performans karakterlerin yüksek olması amacıyla CMV'e özgü primer ve prob NCBI veritabında tasarlanmıştır. Geliştirilen tanı kitinin performans karakterlerini belirlemek amacıyla doğrulama testleri yapılmıştır.

Çalışmada PCR reaksiyonları için reaksiyon bileşen miktarları ve sıcaklık değerleri için optimizasyon çalışmaları ek maliyet getirmeleri sebebiyle yapılmamıştır. Ancak literatüre göre PCR deneyleri için optimum sıcaklık ve reaksiyon bileşenleri değerleri test performansını önemli ölçüde etkilemektedir [92]. Bu yüzden ilerleyen dönemlerde PCR deneyleri için optimizasyon çalışmaları yapılarak optimum değerlerde deneyler tekrar yapılarak farklı bir çalışma dizayn edilebilir. PCR reaksiyon performansı etkileyen önemli bir etmen olan internal kontrol geni de ek maliyet getirmesinden dolayı çalışmada kullanılmamıştır. Ancak literatürdeki çalışmalara bakıldığında internal kontrol geni sayesinde deney koşullarında olan inhibisyonların gözlendiği ve yanlış negatif, pozitif sonuçların önüne geçildiği belirtilmiştir [131]. Bu çalışmada maliyet kısıtlılığı nedeniyle internal kontrol geni kullanılmaması çalışmanın eksikliğidir. İlerleyen dönemlerde internal kontrol geni kullanılarak çalışma tekrar dizayn edilebilir.

Çalışmada CMV *pp65* konservatif bölgesine özgü primer ve prob NCBI veritanında

tasarlanmıştır. Literatür araştırması yapıldığında primer tasarımında uzunluğunun 18-24 nt, erime sıcaklıklarının 52-58 °C ve erime sıcaklıkları farkı 5 °C'den az, 3'ucunda Guanin veya Sitozin içermemesi, Guanin-Sitozin oranlarının %50 ve üzerinde, dinükleotit tekrarı ardışık baz tekrarı içermemesi, self complementarity skorunun en fazla 12, self 3' complementarity skorunun en fazla 5 olması gerektiği bildirilmiştir [81]. Prob tasarımda ise literatürdeki çalışmalara bakıldığında erime sıcaklıklarının primerlerin erime sıcaklık değerlerinden yüksek 57-63 °C arasında, uzunluğu 18-27 nt, 5' ucunda Guanin bazı içermemesi, self complementarity ve self 3'complementarity skorların 12'den küçük olması gerektiği belirtilmiştir [81]. Bu çalışmada ise yüksek performansa karakterli tanı kiti geliştirmek amacıyla hedef özgü tasarlanan ileri ve geri primerlerin uzunluğu 20 nt, erime sıcaklıkları 59 °C, Guanin-Sitozin oranları sırasıyla %55 ile %60, self complementarity skorları sırasıyla 2 ve 3, self 3'complementarity skorları 0 elde edilmiş ve tasarlanan primerler ardışık dinükleotit tekrarı içermemektedir. Tasarlanan prob ise uzunluğu 24 nt, Guanin-Sitozin oranı %62, erime sıcaklığı 60 °C'dir ve 5' ucunda Guanin bazı içermemektedir. Self complementarity skoru 5, self 3'complementarity skoru ise 3 elde edilmiştir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında tasarlanan primerlerin ve probun homoloji analizinin çalışmanın özgüllüğü açısından önemli bir parametre olduğu ve bu analizin BLAST veri tabanından yapılabileceği belirtilmiştir [81]. Ancak çalışmada primerler ve probun benzer sekanslarla homoloji açısından analizi yapılmamıştır ve primerler arası hetero-dimer oluşumuna da bakılmamıştır. Bu çalışmanın eksikliğidir. İlerleyen dönemlerde tasarlanan primer ve prob için homoloji analizine ve hetero-dimer oluşumuna başka bir çalışmada bakılıp yeniden çalışma dizayn edilebilir.

Çalışmada geliştirilen tanı kitlerinin performans kriterlerini belirlemek amacıyla doğrulama testleri Microsof Excel fonksiyonları ile yapılmıştır. Doğrulama testleri kapsamında cut-off skoru, LoD değeri, doğrusal aralık, analitik özgüllük, kesinlik, tanısal özgüllük ve tanısal duyarlılık parametreleri belirlenmiştir.

Çalışmada geliştirilen sistemin cut-off skorunu belirlemek amacıyla prototip sistemle çalışılan 21 negatif örneğin floresan yoğunluk okuma değerlerinin ortalaması (34,43), ve standart sapması 0,886 hesaplanmıştır. Bu değerler ortalama +2 standart sapma yönteminde kullanılarak cut-off skoru 36,198 olarak hesaplanmıştır. Bu değer doğrusallık grafiği denklemi kullanılarak 383 kopya/ml olrak elde edilmiştir. Elde edilen cut-off değeri ile örneklerin floresan okuma değerleri karşılaştırıldığında bir yalancı pozitif, bir yalancı negatif

sonuç elde edilmiştir. Geliştirilen prototip sistemin doğru tanıladığı 46 numune sayısının, referans sistem ile tanılan 48 numune sayısına oranlanmasıyla %95,83'lük (46/48*100) başarı oranı elde edilmiştir ve bu oran %95 ve üzeri hedef başarı kriterini sağlamıştır. Literatürde CMV Real-Time PCR tanı kitinde optimal cut-off skoru belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada 164 hasta örneği ile çalışılmıştır ve optimal cut-off değeri 1130 kopya ml olarak belirlenmiştir [93]. Başka bir çalışmada ise Real-Time PCR tanı kitinin optimal cut-off değerini belirlemek amacıyla 97 örnekle çalışılmış ve cut-off değeri 880 kopya/ml olarak elde edilmiştir [94]. Yapılan bu çalışmalara bakıldığında elde ettikleri cut-off değerlerinin tez çalışmasında elde edilen 383 kopya/ml değerinden oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumun nedeni olarak tez çalışmasında kullanılan 48 örnek sayısının, literatürdeki çalışmalarda kullanılan örnek sayısından az olmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. Geliştirilen tanı kiti cut-off skoru dorğulamasında %95,83'lük başarı oranı elde etmesine rağmen ilerleyen dönemlerde tanı kitinin cut-off skoru doğrulaması daha geniş örnek sayısı ile tekrar çalışılabilir.

Çalışmada geliştirilen sistemin analitik duyarlılığın ölçüsü olan LoD değeri 10 numunenin 12 tekrarlı olarak çalışılması sonucu elde edilmiştir. LoD hesaplanmasında, doğrusal olmayan verileri doğrusal değerlere dönüştüren bir yöntem olan probit analizi yöntemi uygulanmış ve LoD değeri 279 kopya/ml olarak elde edilmiştir. Literatüre bakıldığında CMV Real-Time PCR tanı kitlerinin LoD hesaplamasının yapıldığı bir çok tanı kiti vardır. CMV'ye özgü geliştirilen Real-Time PCR tanı kitinin 32 örnekle doğrulamasının yapıldığı çalışma sonucunda geliştirilen sistemin LoD değeri 265 kopya/ml olarak elde edilmiştir [5]. Başka bir çalışmada ise yeni geliştirilen Real-Time PCR testinin doğrulama çalışması kapsamında 36 örnekle çalışılmış ve sistemin LoD değeri probit analizi ile 248 kopya/ml elde edilmiştir [4]. Çalışmalarda kullanılan örnek sayılarının tez çalışmasınında kullanılan 48 örnek sayısına yakın olmasından dolayı çalışmarın LoD değerleri birbirlerine yakın elde edilmiştir. Literatürde piyasada bulunan CMV Real-Time PCR tanı kitlerinin doğrulamalarının yapıldığı çalışmalar sonucunda elde edilen LoD değerleri, çalışmalarda kullanılan örnek ve tekrar sayıları Tablo 5.1'de gösterilmiştir [82,83,84,85,86]. Tablodaki değerlere bakıldığında tüm ticari tanı kitlerinin LoD değeri prototip sistemin LoD değerinden düşük elde edilmiştir. Bu durumun nedeni olarak ticari tanı kitlerin daha fazla örnek grubuyla ve daha fazla tekrar sayılarıyla prototip sistemin daha az örneklem grubu ve daha az tekrar sayısı ile çalışmış olması düşünülmüştür. Ancak yine geliştirilen tanı kiti literatürdeki kitlerin değerleri ile karşılaştırıldığında LoD değeri açısından ortalama bir

başarı elde etmiştir. Geliştilen tanı kitinin LoD değeri ilerleyen dönemlerde daha fazla örnek ve tekrar sayısı ile çalışılabilir.

Çalışmada analitik özgüllük belirlenmesi amacıyla referans sistem ile tanılanmış 18 farklı patojene sahip numune prototip sistem ile 12 tekrarlı çalışılmıştır. Çalışma sonucunda prototip sistem ile tüm sonuçlar negatif olarak tanılanmıştır. Geliştirilen sistemin analitik özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir. Tanı testlerinde analitik özgüllük değeri %95 ve üzeri başarı kriteri olduğundan dolayı geliştirilen sistem analitik özgüllük açısından başarılı kabul edilmiştir. Literatürdeki yapılan çalışmalara bakıldığında, yeni geliştirilen CMV Real-Time PCR tanı kitinin analitik doğrulama çalışması kapsamında 32 farklı patojenle 12 tekrarlı çalışılmış ve tanı kitinin analitik özgüllük değeri %95,8 elde edilmiştir [15]. Bu çalışma sonucunun tez çalışması sonucundan daha düşük elde edilmesinin nedeni daha fazla çeşit patojen ile çalışmış olması olabilir. Başka bir çalışmada ise yeni geliştirilen CMV Real-Time PCR tanı kitinin analitik özgüllüğü belirlenmesinde 16 farklı patojenle 16 tekrarlı çalışılmış ve sistemin analitik özgüllüğü %99 elde edilmiştir [14]. Bu sonuçlara bakıldığında geliştirilen tanı kitinin analitik özgüllük değeri, literatürdeki yapılan çalışmalar ile yakın elde edilmiştir. Literatürde mevcut ticari CMV Real-Time PCR tanı kitlerinin doğrulamalarının yapıldığı çalışmalar sonucunda elde edilen analitik özgüllük değerleri ve çalışmada kullandıkları patojen sayıları Tablo 5.1'de gösterilmiştir [82,83,84,85,86]. Ticari 1,2 ve 3 tanı kitleri 24 farklı patojen kullanmış ve %100 analitik özgüllük oranı elde etmiştir. Ticari 4, 18 ve ticari 5 tanı kiti ise 16 farklı patojen kullanarak her iki tanı kitide %100 analitik özgüllük oranı elde etmiştir. Bu tanı kitlerinin analitik özgüllük değerleri ile geliştirilen tanı kitinin analitik özgüllük değeri uyumlu elde edilmiştir. Ancak geliştirilen sistemin farklı patojen çeşitleriyle analitik özgüllük değerinin ne olacağı bilinmemektedir. Bu yüzden geliştirilen sistemin ilerleyen dönemlerde daha fazla sayıda farklı patojen çeşitleri ile analitik özgüllük değeri tekrar çalışılabilir.

Çalışmada doğrusal aralığı belirlemek amacıyla 6 numunenin viral yük miktarlarına karşı denk gelen floresan yoğunluk okumaların grafiği Excell fonksiyonları ile elde edilmiştir. Elde edilen grafiğin denklemi (y=0,2933-76,08), R^2 değeri 0,993 olarak hesaplanmıştır. R^2 değeri 1'e oldukça yakın elde edildiğinden sistem doğrusal olarak kabul edilmiştir. Bu sonuç geliştirilen sistemin 575 kopya/ml ile 1150 kopya/ml arasında doğrusal cevaplar verdiğini göstermektedir. Literatürde yapılan çalışmalardan elde edilen ticari tanı kitlerinin doğrusal aralık ve R^2 değerleri ile geliştirilen tanı kitinin değerleri Tablo 5.1.'de

gösterilmiştir [82,83,84,85,86]. Ticari tanı kitlerinin R^2 değerleri ile geliştirilen tanı kitinin R^2 değeri oldukça yakın elde edildiği görülmüştür. Ancak ticari tanı kitlerinin doğrusal aralık değerleri oldukça geniş bir aralıkta elde edilirken prototip sistemin doğrusal aralık değeri dar elde edilmiştir. Ticari tanı kitleri doğrusal aralık tayin çalışmalarında LoD değerlerine yakın bir değerden ve geniş bir aralıkta çalışmışlardır. Geliştirilen tanı kiti çalışıldığı numune aralığında doğrusal sonuçlar elde etse de bu aralık dışında nasıl bir sonuç vereceği bilinmemektedir. Bu sebeple ilerleyen dönemlerde geliştirilen tanı kitinin doğrusal aralık çalışması alt limiti LoD değerine yakın bir değerden daha geniş numune miktarları ve örnekleri ile tekrar çalışılabilir.

Çalışmada kesinlik test edilmesinde viral yük miktarı 690 kopya/ml olarak belirlenen örnek 16 tekrarlı çalışılması çalışılmış ve elde edilen değerler kullanılarak varyasyon katsayı %3,12 olarak hesaplanmıştır. Tanı testlerinde bu değerin %5 altında olması başarılı olarak kabul edildiğinden dolayı sistem kesinlik açısından başarılı kabul edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında yeni geliştirilen CMV Real-Time doğrulama çalışması kapsamında kesinlik doğrulaması 16 tekrarlı olarak çalışılmış ve varyasyon katsayısı %2,6 elde edilmiştir [111]. Başka bir çalışmada ise geliştirilen yeni CMV Real-Time PCR tanı kitinin kesinlik doğrulaması 24 tekrarlı olarak çalışılmış ve varyasyon katsayısı %0,7 elde edilmiştir [116]. Bu çalışmaların varyasyon katsayı değerleri ile geliştirilen sistemin varyasyon katsayısı değeri uyumlu elde edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalardan elde edilen ticari tanı kitlerinin varyasyon katsayısı değerleri ve tekrar sayıları Tablo 5.1.'de gösterilmiştir [82,83,84,85,86]. Ticari 1, 3 ve 5 tanı kitlerinin varyasyon katsayı değerleri son derece başarılı elde edilmiştir. Bu tanı kitlerinin varyasyon katsayısı değeri ile geliştirilen sistemin varyasyon katsayısı değeri oldukça yakın elde edilmiştir. Ancak bu ticari tanı kitlerinin kesinlik çalışmasında daha fazla tekrar sayısı kullanılmıştır. Bu doğrultuda geliştirilen sistemin fazla tekrar sayısında varyasyon katsayısı değerinin ne olacağı bilinmemektedir. İlerleyen dönemlerde geliştirilen tanı kitinin kesinlik doğrulaması daha fazla tekrar sayısında tekrar çalışılabilir. Çalışmada kesinlik doğrulaması ek maliyet getirmemesi amacıyla tek numune örneği ile yapılmıştır. Ancak ilerleyen dönemlerde sistemin LoD değerine yakın bir numune, viral yükü yüksek bir numune ve bu iki değer arasında olan bir değerde 3 farklı numune ile kesinlik doğrulaması yapılması tanı kitinin güvenilirliğini arttıracağından dolayı önerilmektedir.

Çalışmada tanısal özgüllüğü belirlenmesi amacıyla 21 negatif numune kullanılmış ve

tanısal özgüllük değeri %95,2 olarak elde edilmiştir. Tanı testlerinde tanısal özgüllük değeri %95 ve üzeri başarı kriteri olarak kabul edildiğinden dolayı geliştirilen sistemin tanısal özgüllüğü başarılı olarak kabul edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında geliştirilen yeni CMV Real-Time PCR tanı kiinin doğrulama çalışması 300 örnek ile yapılmış ve kitin tanısal özgüllüğü %99 elde edilmiştir [102]. Başka bir çalışmada ise geliştirilen yeni CMV Real-Time PCR tanı kitinin doğrulaması 153 örnek ile yapılmış ve kitin özgüllüğü %100 elde edimiştir [63]. Literatürde yapılan çalışmalardan elde edilen ticari tanı kitlerinin tanısal özgüllük değerleri ve örnek sayıları Tablo 5.1.'de gösterilmiştir [82,83,84,85,86]. Ticari 1,2,4 ve 5 tanı kitleri yüksek tanısal özgüllük oranı elde etmiştir. Ticari 3 tanı kiti ise tanısal özgüllük olarak iyi bir oran elde etsede %95 başarı kriterinin altında kalmıştır. Geliştirilen kitin tanısal özgüllük oranı, literatürdeki doğrulama çalışmalarından elde edilen tanısal özgüllük oranları ile yakın elde edilmiştir. Ancak literatürde yapılan tanısal özgüllük çalışmalarında kullanılan örnek sayısına bakıldığında, tez çalışmasında kullanılan numune sayısının oldukça az olduğu görülmektedir. Bu sebeple ilerleyen dönemlerde geliştirilen sistemin tanısal özgüllüğü daha fazla örneklem sayısı ile yeniden test edilebilir.

Geliştirilen sistemin tanısal duyarlılığını belirlemek amacıyla 27 pozitif numune kullanılmış ve tanısal duyarlılık değeri %96,3 elde edilmiştir. Tanı testlerinde tanısal duyarlılık değeri için başarı kriteri %95 ve üzeri olarak kabul edildiğinden dolayı prototip sistemin tanısal duyarlılığı başarılı olarak kabul edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında geliştirilen yeni CMV Real-Time PCR tanı kitinin duyarlılık çalışması 84 örnek ile yapılmış ve tanısal duyarlılık oranı %100 elde edilmiştir [62]. Başka bir çalışmada ise geliştirilen yeni CMV Real-Time PCR tanı kitinin duyarlılık çalışması 98 örnek ile yapılmış ve tanısal duyarlılık oranı %99 elde edilmiştir [72]. Literatürde yapılan çalışmalardan elde edilen ticari tanı kitlerinin tanısal duyarlılık değerleri ve örnek sayıları Tablo 5.1'de gösterilmiştir [82,83,84,85,86]. Ticari 1,2,4 ve 5 tanı kitleri yüksek tanısal duyarlılık oranları elde etmiştir. Ticari 3 tanı kiti iyi bir duyarlılık oranı elde etsede %95 kriterinin altında kalmıştır. Literatürdeki bu çalışmaların tanısal duyarlılık oranı ile geliştirilen tanı kitinin tanısal duyarlılık oranı yakın elde edilmiştir. Ancak literatürde yapılan tanısal özgüllük çalışmalarında kullanılan örnek sayısına bakıldığında, tez çalışmasında kullanılan numune sayısının oldukça az olduğu görülmektedir. Bu sebeple ilerleyen dönemlerde geliştirilen sistemin tanısal özgüllüğü daha fazla örneklem sayısı ile yeniden test edilebilir

Tanı Kitleri CMV	Analitik Duyarlılık (LOD) Tekrar sayıları Örnek sayıları	Analitik Özgüllük Ve Patojen sayıları	Doğrusal Aralık Ve R^2	Kesinlik (Varyasyon Katsayısı-%CV) Ve Tekrar Sayıları	Tanısal Duyarlılık Ve Örnek Sayıları	Tanısal Özgüllük Ve Örnek Sayıları	Cut off skoru
Prototip	279 kopya/ml Tekrar 12 Örnek 21	%100- Patojen 18	575-1150 kopya/ml R^2=0,98	%3,12 Tekrar 16	%96,3	%95,2	36,198
Ticari 1	39,56 kopya/ml Tekrar 24 Örnek 404	%100 Patojen 24	30-$7,2*10^7$ kopya/ml R^2=0,98	%2,87 Tekrar 48	%100 Örnek 126	%100 Örnek 126	_
Ticari 2 Qiagen Artus®	139 kopya/ml Tekrar 16 Örnek 90	%100 Patojen 24	$1,2*10^2$-$5,3.10^6$ kopya/ml R^2= 0,99	%14,38 Tekrar 12	%100 Örnek 156	%84,8 Örnek 156	_
Ticari 3 232 örnek	286 kopya/ml Tekrar 16 Örnek232	%100 Patojen 24	$3*10^2$-$6,4*10^5$ kopya/ml R^2=0,98	%2,8 Tekrar 24	%92,86 Örnek 112	%90,67 Örnek 112	_

Ticari 4	84 kopya/ml Tekrar 24 Örnek 83	%100 Patojen 18	$70\text{-}8*10^5$ R^2= 0,99	%13 Tekrar 12	%100 Örnek 96	%100 Örnek 96	_
Ticari 5 100	200 kopya/ml Tekrar 24 Örnek 100	%100 Patojen 16	$2*10^2$-$7*10^6$ R^2=0,99	%1,52 Tekrar 24	%99 Örnek 116	%100 Örnek 116	_

Tablo 5. 1. CMV PCR tanı kitleri performans değerleri [82,83,84,85,86].

Geliştirilen tanı kitinin fiyatı ile Tablo 5.1'de yer alan 5 ticari tanı kitinin 96 test için fiyat karşılaştırılması Tablo 5.2'de gösterilmektedir [132]. Bu tabloya göre geliştirilen tanı kitinin mevcut ticari tanı kitlerine kıyasla uygun fiyatlı olduğu görülmektedir.

CMV Tanı Kitleri	1 Partideki Test Sayısı	Fiyatlar
Prototip	96	112 $
Ticari 1	96	192 $
Ticari 2	96	180 $
Ticari 3	96	172 $
Ticari 4	96	175 $
Ticari 5	96	144 $

Tablo 5.2. CMV PCR tanı kitleri test sayıları ve fiyatları [132].

6. SONUÇ

Sitomegalovirüs, yaygın enfeksiyona neden olan virüsler arasında dünyada ve ülkemizde ilk sıralarda yer almaktadır. Enfeksiyon tansında serolojik testler, kültür testleri ve moleküler testler sık tercih edilmektedir. Kültür testleri hızlı sonuç vermesine karşın duyarlılığı ve özgüllüğü düşük testlerdir. Serolojik testler arasında hastanın antikor titrelerindeki değişimi ölçerek tanı koymaya yarayan ELISA yöntemi hızlı ve kolay bir tanı yöntemi olmasına karşın hastalığın erken evrelerinde antikor seviyelerinin ölçülememesinden dolayı duyarlılığı düşük bir tanı yöntemidir. Kültür ve serolojik testlerin bu dezavantajlarından dolayı günümüzde moleküler testlere karşı ilgi artmıştır. Moleküler testler arasında Konvensiyonel PCR, Multipleks PCR, Nested PCR, Dijital PCR ve kantitatif sonuç veren Real-Time PCR vardır. Enfeksiyon tanısında en çok tercih edilen yöntem hızlı, güvenilir ve kantitatif sonuç vermesi nedeniyle Real-Time PCR yöntemidir. Ancak Real-Time PCR cihazları çok pahalı sistemler olması nedeniyle tanı merkezleri ve toplum bu tanı yöntemine kolayca ulaşamamaktadır. Ülkemizde bu denli yaygın olan virüsün tanısını yaygınlaştırmak amacıyla bu tez kapsamında end-point özellikli Denovo cihazda çalışan tek florofor boyalı uygun fiyatlı tanı kiti geliştirilmiş ve doğrulama testleri yapılmıştır.

Geliştirilen tanı kitinin yüksek performans karakterli olması amacıyla hedef özgü ileri, geri primerler ve prob NCBI veritabanında tasarlanmıştır.

Çalışmada tanı kitinin doğrulama çalışmalarında cut-off skoru, LoD değeri, analitik özgüllük, doğrusal aralık, kesinlik, tanısal özgüllük ve tanısal duyarlılık parametreleri çalışılmıştır. cut-off değeri %95 güven aralığında (36,198), LoD değeri 279 kopya/ml, analitik özgüllük değeri (%100), doğrusal aralık denklemi (y=0,2933x-76,08), doğrusallık ölçüsü olan R^2 değeri (0,993), kesinlik ölçüsü olan varyasyon katsayısı (%3,12), tanısal özgüllük oranı (%95,2), tanısal duyarlılık oranı ise %96,3 olarak elde edilmiştir. Tanı testlerinde tanısal özgüllük ve duyarlılık değerlerinin %95 ve üzeri olması başarılı olduğundan dolayı sistem bu parametreler açısından başarılı sonuçlar elde etmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında ‘’Geliştirilen tanı kitinin doğrulama test sonuçları %95’in üzerinde doğrusal ve kesin bir sistemdir.’’ tez hipotezi 1 ve mevcut olan tanı kitleri ile yapılan fiyat karşılaştırılması sonucunda ‘’Geliştirilen tanı kiti uygun fiyatlıdır.’’ Tez hipotezi 2

desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

[1] L. Álvarez-Hernández, J. E. Cuevas-Castillejos, H. Cuevas-Castillejos, C. M. Aboitiz-Rivera, and R. Blachman-Braun, "Different clinical manifestations in two siblings with cytomegalovirus infection," *Revista Médica del Hospital General de México*, vol. 80, no. 3, pp. 174–177, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.hgmx.2016.06.002.

[2] T. M. Lanzieri, S. C. Dollard, S. R. Bialek, and S. D. Grosse, "Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 22. Elsevier, pp. 44–48, 2014. doi: 10.1016/j.ijid.2013.12.010.

[3] J. Jebbink, X. Bai, B. B. Rogers, D. B. Dawson, R. H. Scheuermann, and R. Domiati-Saad, "Development of Real-Time PCR Assays for the Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus, Comparison of TaqMan Probes, and Molecular Beacons."

[4] M. Boeckh *et al.*, "Optimization of Quantitative Detection of Cytomegalovirus DNA in Plasma by Real-Time PCR," *J Clin Microbiol*, vol. 42, no. 3, pp. 1142–1148, Mar. 2004, doi: 10.1128/JCM.42.3.1142-1148.2004.

[5] B. Herrmann *et al.*, "Comparison of a Duplex Quantitative Real-Time PCR Assay and the COBAS Amplicor CMV Monitor Test for Detection of Cytomegalovirus," *J Clin Microbiol*, vol. 42, no. 5, pp. 1909–1914, 2004, doi: 10.1128/JCM.42.5.1909-1914.2004.

[6] Ş. Ataman *vd.*, "ANTALYA'DA SİTOMEGALOVİRUS SEROEPİDEMİYOLOJİSİNİN TOPLUM KAYNAKLI KESİTSEL BİR ÇALIŞMA İLE ARAŞTIRILMASI VE TÜRKİYE VERİLERİNİN DERLENMESİ * INVESTIGATION OF CYTOMEGALOVIRUS SEROEPIDEMIOLOGY IN ANTALYA WITH A POPULATION-BASED CROSS-SECTIONAL STUDY AND REVIEW OF RELATED DATA IN TURKEY."

[7] Z. Ç. Karakoç, D. Taşçıoğlu, S. Tekin, ve B. Şimşek, "Sağlıklı erişkinde akut sitomegalovirus hastalığı: Dört olgu sunumu," *KLIMIK Derg*, vol. 29, no. 1, pp. 39–42, Apr. 2016, doi: 10.5152/kd.2016.09.

[8] M. J. Cannon, D. S. Schmid, and T. B. Hyde, "Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection," *Reviews in Medical Virology*, vol. 20, no. 4. pp. 202–213, Jul. 2010. doi: 10.1002/rmv.655.

[9] H. Miller *et al.*, "A Novel Multiplexed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of IgG Seroreactivity to Cytomegalovirus (CMV) UL144," *J Clin Microbiol*, vol. 59, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.1128/JCM.00964-21.

[10] S. Eventov-Friedman *et al.*, “Saliva Real-Time Polymerase Chain Reaction for Targeted Screening of Congenital Cytomegalovirus Infection,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 220, no. 11, pp. 1790–1796, Oct. 2019, doi: 10.1093/infdis/jiz373.

[11] S. C. Li, K. J. Sparks, and L. S. Sender, “Implementation and Validation of the Roche Light Cycler 480 96-Well Plate Platform as a Real-Time PCR Assay for the Quantitative Detection of Cytomegalovirus (CMV) in Clinical Specimens Using the Luminex MultiCode ASRs System,” *Med Sci (Basel)*, vol. 8, no. 1, Mar. 2020, doi: 10.3390/medsci8010014.

[12] M. K. Ali, J. S. Shia, and H. D. Al- Marsome, “Detection of HSV and CMV in pregnant and miscarriage women by ELISA and real time PCR assay,” *Res J Pharm Technol*, vol. 12, no. 9, pp. 4090–4094, Sep. 2019, doi: 10.5958/0974-360X.2019.00704.2.

[13] A. E. Anoh *et al.*, “Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection among a Rural Population of Côte d’Ivoire,” *Viral Immunol*, vol. 30, no. 1, pp. 54–57, Jan. 2017, doi: 10.1089/vim.2016.0044.

[14] W. D. Rawlinson *et al.*, “Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 17, no. 6. Lancet Publishing Group, pp. e177–e188, Jun. 01, 2017. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30143-3.

[15] A. A. A. Al-Kzaz *et al.*, “Quantitative Detection of human Cytomegalovirus DNA in pregnant women in Iraq using Real-time PCR,” 2014.

[16] A. M. Kearns, M. Guiver, V. James, and J. King, “Development and evaluation of a real-time quantitative PCR for the detection of human cytomegalovirus,” 2001.

[17] K. Kh Ibrahim Al-kayalli, M. K. Khudair Al-Azawy, and A. TNasser Al-Azawy, “EVALUATION OF SEROPREVALENCE OF HERPES SIMPLEX VIRUS IgG ANTIBODY IN BAQUBA CITY BY USING ELISA TECHNIQUE,” vol. 11, no. 2, 2015.

[18] J. Kuang, X. Yan, A. J. Genders, C. Granata, and D. J. Bishop, “An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research,” *PLoS One*, vol. 13, no. 5, May 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0196438.

[19] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, “Real Time Quantitative PCR.”

[20] D. Fraga, T. Meulia, and S. Fenster, “Real-Time PCR,” *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, vol. 2014, pp. 10.3.1-10.3.40, 2014, doi: 10.1002/9780470089941.et1003s08.

[21] S. A. Ross *et al.*, “Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 210, no. 9, pp. 1415–1418, Nov. 2014, doi: 10.1093/infdis/jiu263.

[22] T. C. Lorenz, “Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 63, May 2012, doi: 10.3791/3998.

[23] M. Kubista *et al.*, “The real-time polymerase chain reaction,” *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, no. 2–3. pp. 95–125, Apr. 2006. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

[24] P. Carlier, N. Harika, R. Bailly, and G. Vranken, “Laboratory evaluation of the new access® cytomegalovirus immunoglobulin IgM and IgG assays,” *Journal of Clinical Virology*, vol. 49, no. 3, pp. 192–197, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.jcv.2010.07.024.

[25] T. M. Lanzieri *et al.*, “Seroprevalence of cytomegalovirus among children 1 to 5 years of age in the United States from the national health and nutrition examination survey of 2011 to 2012,” *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 22, no. 2, pp. 245–247, Feb. 2015, doi: 10.1128/CVI.00697-14.

[26] D. J. Wolff, D. L. M. Heaney, P. D. Neuwald, K. A. Stellrecht, and R. D. Press, “Multi-site PCR-based CMV viral load assessment-assays demonstrate linearity and precision, but lack numeric standardization: A report of the association for molecular pathology,” *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 11, no. 2, pp. 87–92, 2009, doi: 10.2353/jmoldx.2009.080097.

[27] T. GÜNEL, “Gen anlatımının kantitatif analizi,” *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, pp. 763–767, 2007.

[28] S. Gantt *et al.*, “Cost-effectiveness of universal and targeted newborn screening for congenital cytomegalovirus infection,” *JAMA Pediatr*, vol. 170, no. 12, pp. 1173–1180, Dec. 2016, doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.2016.

[29] T. D. Schmittgen and K. J. Livak, “Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method,” *Nat Protoc*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108, May 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.73.

[30] A. Uysal *et al.*, “Cytomegalovirus and rubella seroprevalence in pregnant women in Izmir/Turkey: Follow-up and results of pregnancy outcome,” *Arch Gynecol Obstet*, vol. 286, no. 3, pp. 605–608, Sep. 2012, doi: 10.1007/s00404-012-2353-z.

[31] C. Marsico and D. W. Kimberlin, “Congenital Cytomegalovirus infection: Advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment,” *Italian Journal of Pediatrics*, vol. 43, no. 1. BioMed Central Ltd., Apr. 17, 2017. doi: 10.1186/s13052-017-0358-8.

[32] M. Zuhair *et al.*, “Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis,” *Reviews in Medical Virology*, vol. 29, no. 3. John Wiley and Sons Ltd, May 01, 2019. doi: 10.1002/rmv.2034.

[33] R. Lachmann *et al.*, “Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany,” *PLoS One*, vol. 13, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0200267.,

[34] S. Broeders *et al.*, “Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 37, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 115–126, 2014. doi: 10.1016/j.tifs.2014.03.008.

[35] N. T. Potter *et al.*, “Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma,” *Clin Chem*, vol. 60, no. 9, pp. 1183–1191, 2014, doi: 10.1373/clinchem.2013.221044.

[36] P. Kralik and M. Ricchi, “A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. FEB. Frontiers Research Foundation, Feb. 02, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.

[37] R. K. Saiki *et al.*, “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase,” *Science (1979)*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491, 1988, doi: 10.1126/science.2448875.

[38] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand, “Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5’-* 3’ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase (ofigonucleotide probe/human immunodeficiency virus),” 1991.

[39] R. Sy, R. E. Rothman, and S. Yang, “PCR-based diagnostics PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings,” 2004.

[40] L. H. Rijsman, J. F. Monkelbaan, and J. G. Kusters, “Clinical consequences of polymerase chain reaction-based diagnosis of intestinal parasitic infections,” *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, vol. 31, no. 11. Blackwell Publishing, pp. 1808–1815, Nov. 01, 2016. doi: 10.1111/jgh.13412.

[41] A. Paniz-Mondolfi *et al.*, “Evaluation and validation of an RT-PCR assay for specific detection of monkeypox virus (MPXV),” *J Med Virol*, vol. 95, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.1002/jmv.28247.

[42] K. C. Halling, I. Schrijver, and D. L. Persons, “Test verification and validation for molecular diagnostic assays,” *Arch Pathol Lab Med*, vol. 136, no. 1, pp. 11–13, Jan. 2012, doi: 10.5858/arpa.2011-0212-ED.

[43] H. R. Shehata, S. Ragupathy, D. Shanmughanandhan, P. Kesanakurti, T. M. Ehlinger, and S. G. Newmaster, “Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods for molecular diagnostic identification of probiotics,” in *Journal of AOAC International*, AOAC International, 2019, pp. 1774–1778. doi: 10.5740/jaoacint.18-0320.

[44] M. Kubista *et al.*, “The real-time polymerase chain reaction,” *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, no. 2–3. pp. 95–125, Apr. 2006. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

[45] R. H. Lekanne Deprez, A. C. Fijnvandraat, J. M. Ruijter, and A. F. M. Moorman, “Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions.”

[46] B. Thornton and C. Basu, “Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software,” *Biochemistry and Molecular Biology Education*, vol. 39, no. 2, pp. 145–154, Mar. 2011, doi: 10.1002/bmb.20461.

[47] W. Feng *et al.*, “Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs,” *Analytical Chemistry*, vol. 92, no. 15. American Chemical Society, pp. 10196–10209, Aug. 04, 2020. doi: 10.1021/acs.analchem.0c02060.

[48] M. Misyura, M. A. Sukhai, V. Kulasignam, T. Zhang, S. Kamel-Reid, and T. L. Stockley, “Improving validation methods for molecular diagnostics: Application of Bland-Altman, Deming and simple linear regression analyses in assay comparison and evaluation for next-generation sequencing,” *J Clin Pathol*, vol. 71, no. 2, pp. 117–124, Feb. 2018, doi: 10.1136/jclinpath-2017-204520.

[49] M. Raymaekers, R. Smets, B. Maes, and R. Cartuyvels, “Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays,” *J Clin Lab Anal*, vol. 23, no. 3, pp. 145–151, 2009, doi: 10.1002/jcla.20307.

[50] D. M. Abdel-Mohsen, A. M. A. Akabawy, M. F. El-Khadragy, A. E. Abdel Moneim, and H. K. Amin, “Green Coffee Bean Extract Potentially Ameliorates Liver Injury due to HFD/STZ-Induced Diabetes in Rats,” *J Food Biochem*, vol. 2023, 2023, doi: 10.1155/2023/1500032.

[51] Z. Wang, K. Lu, X. Liu, Y. Zhu, and C. Liu, “Comparative Functional Genome Analysis Reveals the Habitat Adaptation and Biocontrol Characteristics of Plant Growth-Promoting Bacteria in NCBI Databases,” *Microbiol Spectr*, vol. 11, no. 3, Jun. 2023, doi: 10.1128/spectrum.05007-22.

[52] E. M. Burd, “Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 23, no. 3. American Society for Microbiology, pp. 550–576, 2010. doi: 10.1128/CMR.00074-09.

[53] B. M. Conrad, D. R. Tyner, and M. R. Johnson, “Robust probabilities of detection and quantification uncertainty for aerial methane detection: Examples for three airborne technologies,” *Remote Sens Environ*, vol. 288, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.rse.2023.113499.

[54] V. Pant, S. Pradhan, and K. Gautam, “Basics of laboratory statistics.”

[55] J. A. Garcia, J. Chamorro-Padial, R. Rodriguez-Sanchez, and J. Fdez-Valdivia, “What is the sensitivity and specificity of the peer review process,” *Account Res*, vol. 31, no. 4, pp. 305–326, 2024, doi: 10.1080/08989621.2022.2122817.

[56] M. Abdessadek, M. Kharbach, H. Ben-Saghroune, B. El Amraoui, and Y. Khabbal, “Validation steps and parameters of bioanalytical methods using in clinical studies: A narrative review,” *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 13, no. 8. Open Science Publishers LLP Inc., pp. 68–83, Aug. 01, 2023. doi: 10.7324/JAPS.2023.109956.

[57] H. Chen *et al.*, “Novel aerosol detection platform for SARS-CoV-2: Based on specific magnetic nanoparticles adsorption sampling and digital droplet PCR detection,” *Chinese Chemical Letters*, vol. 34, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.cclet.2022.07.044.

[58] É. Fernandes, M. Barros, and P. Pires, “Validation of a small-scale method for determination of phosphorus in meat and meat products by molecular absorption spectroscopy,” *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 18, no. 3, pp. 2173–2183, Mar. 2024, doi: 10.1007/s11694-023-02304-w.

[59] L. W. D. van Raamsdonk *et al.*, “Introduction to new guidelines for validation of methods to examine visually recognisable substances,” *Food Additives and Contaminants - Part A*, vol. 40, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 12–25, 2023. doi: 10.1080/19440049.2022.2135768.

[60] S. A. Bustin *et al.*, “The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments,” *Clin Chem*, vol. 55, no. 4, pp. 611–622, Apr. 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

[61] S. Broeders, N. Papazova, M. Van den Bulcke, and N. Roosens, “Development of a Molecular Platform for GMO Detection in Food and Feed on the Basis of ‘Combinatory qPCR’ Technology,” in *Polymerase Chain Reaction*, InTech, 2012. doi: 10.5772/37898.

[62] S. Bolotin *et al.*, “Validation of the TaqMan Influenza A Detection Kit and a Rapid Automated Total Nucleic Acid Extraction Method to Detect Influenza A Virus in Nasopharyngeal Specimens,” 2009.

[63] J. Dreier, M. Störmer, and K. Kleesiek, “Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays,” *J Clin Microbiol*, vol. 43, no. 9, pp. 4551–4557, Sep. 2005, doi: 10.1128/JCM.43.9.4551-4557.2005.

[64] L. Meng *et al.*, “Housekeeping gene stability in Pesudomonas aeruginosa PAO1 under the pressure of commonly used antibiotics in molecular microbiology assays,” *Front Microbiol*, vol. 14, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1140515.

[65] J. Dreier, M. Störmer, D. Mäde, S. Burkhardt, and K. Kleesiek, “Enhanced reverse transcription-PCR assay for detection of norovirus genogroup I,” *J Clin Microbiol*, vol. 44, no. 8, pp. 2714–2720, Aug. 2006, doi: 10.1128/JCM.00443-06.

[66] C. Drosten *et al.*, “Ultrasensitive monitoring of HIV-1 viral load by a low-cost real-time reverse transcription-PCR assay with internal control for the 5′ long terminal repeat domain,” *Clin Chem*, vol. 52, no. 7, pp. 1258–1266, Jul. 2006, doi: 10.1373/clinchem.2006.066498.

[67] J. A. Garson, P. R. Grant, U. Ayliffe, R. B. Ferns, R. S. Tedder, and J. Garson, “Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control,” 2005.

[68] G. Johnson, T. Nolan, and S. A. Bustin, “Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 943, pp. 1–16, 2013, doi: 10.1007/978-1-60327-353-4_1.

[69] M. W. A. Molenaar-De Backer, M. De Waal, M. C. Sjerps, and M. H. G. M. Koppelman, "Validation of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA," *Transfusion (Paris)*, vol. 56, no. 2, pp. 440–448, Feb. 2016, doi: 10.1111/trf.13334.

[70] İ. Unat, "Different Types and Modifications of Polymerase Chain Reaction," *Journal of Molecular Virology and Immunology*, Dec. 2022, doi: 10.46683/jmvi.2022.60.

[71] T. W. Clark *et al.*, "Rapid multiplex PCR for respiratory viruses reduces time to result and improves clinical care: Results of a systematic review and meta-analysis," *Journal of Infection*, vol. 86, no. 5, pp. 462–475, May 2023, doi: 10.1016/j.jinf.2023.03.005.

[72] T. Sasaki *et al.*, "Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci," *J Clin Microbiol*, vol. 48, no. 3, pp. 765–769, Mar. 2010, doi: 10.1128/JCM.01232-09.

[73] E. M. Elnifro, A. M. Ashshi, R. J. Cooper, and P. E. Klapper, "Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology," 2000.

[74] Y. Zhao *et al.*, "Multiplex Digital Methylation-Specific PCR for Noninvasive Screening of Lung Cancer," *Advanced Science*, vol. 10, no. 16, Jun. 2023, doi: 10.1002/advs.202206518.

[75] Y. Y. ÖZ, "Gida Patojenleri İçin Dijital Pcr İle Hizli Tespit Yöntemlerinin Geliştirilmesi,'' Doktora Tezi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2023.

[76] M. Smith, "Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays," in *Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition*, vol. 1–5, Elsevier, 2020, pp. 35–44. doi: 10.1016/B978-0-12-814515-9.00053-9.

[77] H. Albayrak, "Sars-Cov-2 Kantitatif Tanisinda Kullanilan Farkli Real-Time Pcr Cihazlarinin Ve Kitlerin Karşilaştirilmasi," Uzmanlık Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 2022.

[78] S. Koptaş ve Y. Bulut, ''Hizli Test İle Covid-19 Pozitifliği Tespit Edilen Hastalarin Elisa Yöntemi İle Igg Ve Igm Sonuçlarinin Değerlendirilmesi," Yüksek Lisans Tezi, Tibbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat, 2022.

[79] F. Barlik, "Pediatrik Yaş Grubunda Anti-Cmv Elisa Testi Sonuçlarinin Değerlendirilmesi," Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 2017.

[80] C. G. Büyükdağ, "Allojenik Ve Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli Yapilan Hastalarda Sitomegalovirüs Reaktivasyonu Ve Hastaliğinin Değerlendirilmesi," Uzmanlık Tezi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2023.

[81] A. Alp, A. Pinar, Ö. Eser, Z. Saribaş, And K. Ergünay, “Real-Time Pcr Kursu Hacettepe Üniversitesi Tip Fakültesi Tibbi Mikrobiyoloji Anabilim Dali Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarlari.”

[82] L. Pang *et al*., ‘’Comparison of LightCycler-Based PCR, COBAS Amplicor CMV Monitora and pp65 Antigenemia Assay of Cytomegalovirus,’’ *Journal of Clinical Microbiology,*vol. 41, no. 7, July 2003.

[83] J. Park *et al.,* ‘’Performance Evaluation of the Real-Q Cytomegalovirus Quantification Kit Using Two Real Time PCR Systems for Cmv DNA in Whole Blood,’’ *Clinical Microbiology,* vol. 36 pp. 603-606, 2016.

[84] A. Tremblay *et al.,* ‘’Cytomegalovirus Quantification in Plasma with Abbott Real- Time CMV And Roche Cobas Amplicor CMV assays,’’ *Journal of Virological Methods,* vol. 225 , pp. 1-3, 2015.

[85] A. Nagel *et al.,* ‘’Characterization of A Universal Screening Approach for Congenital CMV Infection Based on A Highly-Sensitive, Quantitative, Multiplex Real-Time PCR Assay,’’ *Plos One,* vol. 15, no. 1, 2020.

[86] H. Noorbazargan *et al.,* ‘’Comparison of a new in-house HIV-1 TaqMan Real-Time PCR and Three Commercial HIV-1 RNA Quantitative Assays,’’ *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases,* vol. 59, pp. 1-7, 2018.

[87] A. Alp, “İstatistiksel çalışmalarda probit analizi ve uygulama alanları,” Yüksek Lisans Tezi, Matematik Anabilim Dalı, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 2007.

[88] J. P *et al.,* ‘’Determining the 95% Limit of Detection for Waterborne Pathogen Analyses from Primary Concentration to PCR,’’ *Water Research,* vol. 96, pp. 105-113, 2016.

[89] J. R. Sharma Balkishan, “Right choice of a method for determination of cut-off values: A statistical tool for a diagnostic test,” *Asian J Med Sci,* 2014.

[90] P. J. Yeh *et al.*, “Cytomegalovirus Diseases of the Gastrointestinal Tract in Immunocompetent Patients: A Narrative Review,” *Viruses,* vol. 16, no. 3. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Mar. 01, 2024. doi: 10.3390/v16030346.

[91] L. Jenning *et al., ‘’*Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests,’’ *Arch Pathol Lab Med.,* vol. 133, no. 5 pp. 743-755, May. 2009, Doi: 10.5858/133.5.743.

[92] W. Habbal, F. Monem, and B. Gartner, ‘’Optimization of Human Cytomegalovirus LightCycler Real-Time PCR’’ *J Infect Developing Countries,* vol. 2, no. 5, pp. 406-410.

[93] P. Davila *et al.,* ‘’Analysis of A Quantitative PCR Assay for CMV Infection in Liver Transplant Recipients: An Intent to Find The Optimal Cut-off Value,’’ Journal of Clinical Virology, vol. 33, no. 2005, pp. 138-144.

[94] A. Humar, ‘’Clinical Utility of Quantitative Cytomegalovirus Viral Load Determination for Prediting Cytomegalovirus Disease in Liver Transplant Recipients,’’ M.S thesis, Dept. Community Health, Toronto Univ., Toronto, Kanada, 1999.

[95] J. Shi, Y. Wu, M. Cai, and S. Shang, ‘’ Rapid Diagnosis of Herpetic Encephalitis in Children by PCR- Microarray Technology for Simultaneous Detection of Seven Human Herpes Viruses,’’ *European Journal of Pediatrics*, vol. 169, pp. 421-425, 2010.

[96] K. Gourlain *et al.,* ‘’Quantitation of Cytomeglovirus (CMV) DNA by Real-Time PCR for Occurrence of CMV Disease in HIV- Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy,’’ *Journal of Medical Virology,* vol. 69, pp. 401-407, 2003.

[97] E. Reap *et al.,* ‘’Cellular and Humoral Immune Responses to Alphavirus Replicon Vaccine Expressing Cytomegalovirus pp65,’’ *Clinical and Vaccine Immunology,* vol. 14, no. 6, 2007.

[98] C. Gimeno *et al.,* ‘’Quantification of DNA in Plasma by An Automated Real-Time PCR Assay for Surveillance of Active Cytomegalovirus Infection and Guidance of Preemptive Therapy for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients,’’ *Journal of Clinical Microbiology,* vol. 46, no. 10, pp. 3311-3318, 2008.

[99] J. E. Park *et al.,* ‘’Performance Evaluation of the Real-Q Cytomegalovirus (CMV) Quantification Kit Using Two Real-Time PCR Systems for Quantifying CMV DNA in Whole Blood,*’’ Clinical Microbiology,* vol. 36, no. 6, pp. 603-606, 2016.

[100] B. F Paspuel, and M. Bereguiain, ‘’ Analytical and Clinical Evaluation of ‘’AccuPower Sars-CoV-2 Multiplex RT-PCR Kit, ‘' *Clinical Microbiology,* vol. 11, 2021.

[101] M. A. Clari *et al.,* ‘’Comparison of the New Abbott Real-Time CMV Assay and the Abbott CMV PCR Kit for the Quantification of Plasma Cytomegaovirus DNAemia,’’ *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,* vol. 75, pp. 207-209, 2013.

[102] S. Jeong *et al.,* ‘’ Comparison Cytomegalovirüs Qualitative Assay Using Real-Time PCR and Conventional PCR,’’ *Ann Clin Microbiol.,* vol. 16, no. 1, 2013.

[103] R. B. Raggam *et al.,* ‘’Rapid Quantitation of Cytomegalovirus DNA in Whole Blood by A New Molecular Assay Based on Automated Sample Preparation and Real-Time PCR,’’ *Medical Microbiology and Immunology,* vol. 199, pp. 311-316, 2010.

[104] W. Habbal, F. Monem, and B. C. Gartner., ‘’ Comparative Evaluation of Published Cytomegalovirus Primers for Rapid Real-Time PCR: Which Are the Most Sensitive?,’’ *Journal of Medical Microbioology,* vol. 58, pp. 878-883, 2009.

[105] J. E. Botero *et al.,* ‘’Comparison of Nested Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-Time PCR and Viral Culture for The Detection of Cytomegalovirus in Subgingival Samples,’’ *Oral Microbiology and Immunology,* vol. 23, no. 3, 2008.

[106] A. Ducroux *et al.,* ‘’Evaluation of New Commercial Real-Time PCR Quantification Assay for Prenatal Diagnosis of Cytomeglovirus Congenital Infection,’’ *Journal of Clinical Microbiology,* vol. 46, no. 6, pp. 2078-2080, 2008.

[107] M. L. Ville, A. Ducroux, and C. Rouzioux, ‘’Exon 4 of the Human Cytomegalovirus (CMV) Major Immediate- Early Gene as a Target for CMV Real- Time PCR,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 46, no. 4, pp. 1571-1572, 2008.

[108] K. Ikuta *et al.*, ‘’Evaulation of the Indirect and IgM-Capture Anti-Human Cytomegalovirus IgM ELISA Methods as Confirmed by Cytomegalovirus IgG Avidity,’’ *Microbiology and Immunology,* 2019.

[109] M. L. Ville *et al.*, ‘’Monitoring Cytomegalovirus Infection in Adult and Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients by a Real-Time PCR Assay Performed with Blood Plasma,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 41, no. 5, pp. 2040-2046, 2003.

[110] A. Nitsche *et al.,* ‘’Detection of Human Cytomegalovirus DNA by Real- Time Quantitative PCR,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 38, no. 7, pp. 2734-2737, 2000.

[111] B. Z. Wirgart, P. Andersson, and L. Grillner, ‘’ Evaluation of the ReSSO Assay in Realion to the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test and an In-House Nested PCR Method for Detection of Cytomegalovirus DNA,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 43, no. 8, pp. 4057-4063, 2005.

[112] H. S. Al- Janabi *et al.,* ‘’Comparative Evaluation Study of ELISA System and MINIVIDAS System for Detection of CytomegalovirusIgM Antibodies,’’ *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,* vol. 10, no. 10, pp. 2549-2550, 2018.

[113] A. Nicola *et al.,* ‘’Anchor Based Fluorescent Amplicon Generation Assay (FLAG) for Real-Time Measurement of Human Cytomegalovirus, Epstein- Barr Virus, and Varicella- Zoster Virus Viral Loads,’’ *Clinical Chemistry,* vol. 54, no. 11, pp. 1900-1907, 2008.

[114] B. Benas *et al.,* ‘’ Clinical Validation of a Novel ELISpot Basedi in vitro Diagnostic Assay to Monitor CMV-Specific Cell-Mediated Immunity in Kidney Transplant Recipient,’’ *Clinical Chemistry,* vol. 23, 2010.

[115] A. Monte *et al.,* ‘’Analytical Performances of Real-Time PCR by Abbott Real-Time CMV with m2000 for the Detection of Cytomegalovirus in Urine,’’ *Pharmaceutical Sciences and Research,* vol. 74, no. 2, 2016.

[116] U. Nuraeni *et al.,* ‘’Droplet Digital PCR Versus Real-Time PCR for in-house Validation of Porcine Detection and Quantification Protocol: An Artifical Recombinant Plasmid Approach,’’ *Plos One,* vol. 18, no. 7, 2023.

[117] A. Hashish *et al.,* ‘’Development and Validation of a New TaqMan Real-Time PCR for the Detection of *Orhithobacterium Rhinotracheale*,’’ *MDPI,* vol. 10, no. 341, 2022.

[118] N. Serrano *et al.,* ‘’Riginal Brief Validation and Evaluation of An in-house Real-Time RT-PCR Test For the Detection of Sars-CoV-2 Using A Specific RdRp Gene and Endogenous GAPDH Control,’’ *Rev Peru Med Exp Public Health.,* vol. 38, no. 4, pp. 595-600, 2021.

[119] R. Schneider *et al.,* ‘’Validation of a Novel FRET Real-Time PCR Assay for Simultaneous Quantitative Detection and Discrimination of Human Plasmodium Parasites,’’ *Plos One,* vol. 16, no. 6, 2021.

[120] M. Boeckh *et al.,* ‘’Optimization of Quantitative Detection of Cytomegalovirus DNA in Plasma by Real-Time PCR,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 42, no. 3, pp. 1142-1148, 2004.

[121] M. Park *et al.,* ‘’Optimization of Primer Sets and Detection Protocols for Sars-CoV-2 of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Using PCR and Real-Time PCR,’’ *Experimental and Molecular Medicine,* vol. 52, pp. 963-977, 2020.

[122] M. Peris *et al.,* ‘’B-275 Retrospective Study for Mpox Detection: Validation of a Real Time PCR Kit for its Fast Diagnosis,’’ *Clinical Chemistry,* vol. 69, 2023.

[123] M.L. Landry and D. Ferguson, ‘’Comparison of Quantitative Cytomegalovirus Antigenemia Assay with Culture Methods and Correlation with Clinical Disease,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 31, no. 11, pp. 2851-2856, 1993.

[124] A. Erice *et al.,* ‘’Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia Assay Is More Sensitive Than Shell Vial Cultures for Rapid Detection of CMV in Polymorphonuclear Blood Leukocytes,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 30, no. 11, pp. 2822-2825, 1992.

[125] A. Weinberg *et al.,* ‘’Comparison of PCR, Antigenemia Assay, and Rapid Blood Culture for Detection and Prevention of Cytomegalovirus Disease After Lung Transplantation,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 38, no. 2, pp. 768-772, 2000.

[126] L. Marsano *et al.,* ‘’Comparison of Culture and Serology for the Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Kidney and Liver Transplant Recipients.’’ *The Journal of Infectious Disease,* vol. 161, pp. 454-461, 1990.

[127] B. G. Brumback *et al.,* ‘’Comparison of Culture and the Antigenemia Assay for Detection of Cytomegalovirus in Blood Specimens Submitted to a Reference Laboratory,’’ *J Clin Microbiol.,* vol. 35, no. 7, pp. 1819-1821, 1997.

[128] D. Wolff and A. Gerritzen, ‘’Sensitive and Quantitative Cytomegalovirus PCR: Comparison of the LightMix hCMV and the Real Art CMV LC PCR Kits,’’ *Clinical Biochemistry,* vol. 44, pp. 520-549, 2011.

[129] A. M. Kearns *et al.,* ‘’Development and Evaluation of A Real- Time Quantitative PCR for The Detection of Human Cytomegalovirus,’’ *Journal of Virological Methods,* vol. 95, pp. 121-131, 2001.

[130] H. Kamei *et al.,* ‘’Cytomegalovirus (CMV) Monitoring After Liver Transplantation: Comparison of CMV Pp65 Antigenemia Assay with Real-Time PCR Calibrated to WHO International Standart,’’ *Annals of Transplantation,* vol. 21, pp. 131-136, 2016.

[131] F. Cottrez *et al.,* ‘’Quantitative PCR: Validation of the Use of a Multispecific Internal Control,’’ Nucleic Acids Research, vol. 22, no. 13, 1994.

[132] Amazon, ‘’CMV Real-Time PCR Kits,’’ [Online]. Avaiable: https://www.amazon.com.

[133] F.J Finney, Probit Analysis (3rd edition), USA, Cambridge University Press, 1971.

[134] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), ‘’ICTV Virus Taxonomy: 2023 Release,’’ [Online]. Avaiable: https://ıctv.global/taxonomy.

EK-1: PATOJEN, AİLE, CİNS, TÜR BİLGİLERİ [134].

Patojenler	Aile	Cins	Tür
HSV-1	Herpesviridae	Simpleksvirüs	Herpes Simpleks Virüs Tip 1
HSV-2	Herpesviridae	Simpleksvirüs	Herpes Simpleks Virüs Tip 2
EBV	Herpesviridae	Lenfokriptovirüs	Ebstein-Barr Virüs
CT	*Clostridiaceae*	*Clostridium*	*Clostridium tetani*
HIV-1	Retroviridae	Lentivirüs	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü Tip 1
HAV	Picornaviridae	Hepatovirüs	Hepatit A Virüsü
HCV	Flaviviridae	Hepasivirüs	Hepatit C Virüsü
E.coli	*Enterobacteriaceae*	*Escherichia*	*Escherichia coli*
MT	*Mycobacteriaceae*	*Mikobakteri*	*M.tüberküloz*
HPV-16	Papillomaviridae	Alfapapilomavirüsü	İnsan Papillomavirüsü Tip 16
TTV	Anelloviridae	Alfatorkvirüs	Tork Teno Virüs
HHV-8	Herpesviridae	Rhadinovirüs	İnsan Herpesvirüsü Tip 8
HHV-6	Herpesviridae	Roseolovirüs	İnsan Herpesvirüsü Tip 6
H. pylori	*Helicobacteraceae*	*Helikobakter*	*Helikobakter Pilori*
Brucella	*Brucellaceae*	*Brucella*	*Brucella Türleri*
MRSA	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus*	*Stafilokok Aureus*
HBV	Hepadnaviridae	Orthohepadnavirüs	Hepatit B Virüs
Toksoplazma (TOXO)	Sarcocystidae	Toksoplazma	Toksoplazma Gondii

EK-2: VİRAL YÜKLERİN 12 TEKRAR DENEY SONUÇLARI

	Viral Yük Miktarı 297 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	45,42	+
	44,28	+
	44,31	+
	45,02	+
	45,08	+
	45,11	+
	45,12	+
	45,15	+
	45,38	+
	45,41	+
	45,35	+
	45,37	+
Ortalama	45,08	Cevap Oranı= %100
Standar Sapma	0,39	

	Viral Yük Miktarı 284 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	38,14	+
	38,12	+
	39,17	+
	38,16	+
	38,17	+
	38,46	+
	37,45	+
	38,33	+
	38,24	+
	38,26	+
	38,19	+
	37,55	+
Ortalama	38,19	Cevap Oranı= %100
Standart Sapma	0,43	

	Viral Yük Miktarı 280 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	37,21	+
	37,23	+
	37,45	+
	37,23	+
	37,28	+
	37,82	+
	37,56	+
	38,01	+
	38,02	+
	37,18	+
	37,14	+
	37,51	+
Ortalama	37,47	Cevap Oranı= %100
Standart Sapma	0,321728287	

	Viral Yük Miktarı 278 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	36,97	+
	36,78	+
	36,79	+
	36,84	+
	36,87	+
	36,35	+
	36,18	-
	36,64	+
	36,52	+
	36,27	+
	36,56	+
	36,55	+
Ortalama	36,61	Cevap Oranı= %91,7
Standart Sapma	0,25	

	Viral Yük Miktarı 274 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	36,21	+
	36,23	+
	36,27	+
	36,29	+
	36,24	+
	36,25	+
	36,11	-
	36,28	+
	36,33	+
	36,15	-
	36,32	+
	36,33	+
Ortalama	36,25	Cevap Oranı= %83,3
Standart Sapma	0,07	

	Viral Yük Miktarı 271 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	36,02	-
	36,2	+
	36,21	+
	36,22	+
	36,09	-
	36,08	-
	36,22	+
	36,23	+
	36,05	-
	36,22	+
	36,03	-
	36,25	+
Ortalama	36,15	Cevaplama Oranı= %58,3
Standart Sapma	0,09	

	Viral Yük Miktarı 266 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	35,88	-
	35,84	-
	35,78	-
	36,01	-
	35,42	-
	36,24	+
	35,68	-
	35,64	-
	36,21	+
	36,23	+
	36,22	+
	35,66	-
Ortalama	35,90	Cevaplama Oranı= %33,3
Standart Sapma	0,28	

	Viral Yük Miktarı 264 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	35,17	-
	35,14	-
	35,26	-
	35,33	-
	35,18	-
	36,22	+
	36,2	+
	35,05	-
	35,16	-
	35,17	-
	35,28	-
	35,27	-
Ortalama	35,37	Cevaplama Oranı= 16,7
Standart Sapma	0,40	

	Viral Yük Miktarı 257 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	34,9	-
	34,01	-
	34,91	-
	34,03	-
	34,26	-
	33,85	-
	34,17	-
	33,54	-
	33,66	-
	33,86	-
	33,25	-
	34,15	-
Ortalama	34,05	Cevaplama Oranı= %0
Standart Sapma	0,49	

	Viral Yük Miktarı 244 kopya/ml 12 Tekrar Sonucu Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Cevap Sonucu
	33,05	-
	33,02	-
	32,9	-
	32,89	-
	32,87	-
	32,88	-
	32,85	-
	32,98	-
	32,45	-
	32,52	-
	32,66	-
	32,65	-
Ortalama	32,81	Cevaplama Oranı= %0
Standart Sapma	0,19	

EK-3: PATOJENLERİN 12 TEKRAR DENEY SONUÇLARI

	HSV1-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	32,36	-
	33,55	-
	32,84	-
	32,78	-
	32,83	-
	33,01	-
	32,95	-
	32,25	-
	32,91	-
	32,66	-
	33,89	-
	33,25	-
Ortalama	32,94	
Standart Sapma	0,46	

	HSV2-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,54	-
	34,23	-
	34,16	-
	34,36	-
	34,25	-
	34,15	-
	33,88	-
	34,36	-
	34,06	-
	34,35	-
	34,34	-
	33,96	-
Ortalama	34,22	
Standart Sapma	0,19	

	EBV-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,15	-
	34,23	-
	34,12	-
	33,87	-
	34,48	-
	34,35	-
	34,3	-
	34,27	-
	34,62	-
	34,26	-
	34,53	-
	34,18	-
Ortalama	34,28	
Standart Sapma	0,20	

	CT-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	33,12	-
	33,15	-
	32,66	-
	33,14	-
	33,18	-
	33,27	-
	33,19	-
	32,95	-
	32,67	-
	33,3	-
	33,08	-
	33,13	-
Ortalama	33,07	
Standart Sapma	0,21	

	HIV1-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,36	-
	34,22	-
	34,5	-
	34,19	-
	35,13	-
	34,54	-
	34,41	-
	34,36	-
	34,38	-
	34,4	-
	34,39	-
	34,28	-
Ortalama	34,43	
Standart Sapma	0,24	

	HAV-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	33,54	-
	33,23	-
	33,25	-
	33,19	-
	33,28	-
	33,67	-
	33,31	-
	33,17	-
	33,35	-
	33,29	-
	33,36	-
	33,32	-
Ortalama	33,33	
Standart Sapma	0,14	

	HCV-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,65	-
	34,45	-
	34,78	-
	34,59	-
	34,99	-
	34,97	-
	35,06	-
	34,81	-
	34,83	-
	35,24	-
	35,28	-
	34,67	-
Ortalama	34,86	
Standart Sapma	0,26	

	E.coli- Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,23	-
	34,07	-
	34,85	-
	35,17	-
	34,66	-
	34,84	-
	34,59	-
	34,31	-
	34,49	-
	34,55	-
	35,02	-
	34,66	-
Ortalama	34,62	
Standart Sapma	0,32	

	MT- Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	33,95	-
	33,79	-
	33,39	-
	33,67	-
	33,69	-
	33,82	-
	33,79	-
	33,77	-
	33,69	-
	33,75	-
	33,83	-
	33,74	-
Ortalama	33,74	
Standart Sapma	0,13	

	HPV16-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,46	-
	34,37	-
	34,33	-
	34,81	-
	34,64	-
	34,68	-
	35,14	-
	34,87	-
	34,85	-
	34,79	-
	34,74	-
	34,72	-
Ortalama	34,7	
Standart Sapma	0,23	

	TTV-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	33,89	-
	33,94	-
	33,52	-
	33,49	-
	33,68	-
	33,82	-
	33,74	-
	34,05	-
	33,64	-
	33,59	-
	33,87	-
	34,25	-
Ortalama	33,79	
Standart Sapma	0,23	

	HHV8-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,68	-
	34,47	-
	34,68	-
	35,24	-
	35,14	-
	34,79	-
	34,89	-
	34,97	-
	34,87	-
	34,67	-
	34,82	-
	34,74	-
Ortalama	34,83	
Standart Sapma	0,21	

	HHV6-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	33,63	-
	33,88	-
	33,97	-
	33,67	-
	33,74	-
	33,72	-
	34,16	-
	33,87	-
	33,9	-
	33,78	-
	34,15	-
	33,85	-
Ortalama	33,86	
Standart Sapma	0,17	

	H. pylori-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,66	-
	35,1	-
	35,34	-
	34,78	-
	34,69	-
	34,72	-
	34,84	-
	34,74	-
	34,86	-
	34,82	-
	34,68	-
	34,97	-
Ortalama	34,85	
Standart Sapma	0,20	

	Brucella-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,35	-
	33,98	-
	33,87	-
	34,03	-
	33,86	-
	33,82	-
	33,84	-
	33,99	-
	33,97	-
	33,86	-
	33,79	-
	33,92	-
Ortalama	33,94	
Standart Sapma	0,15	

	MRSA-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,89	-
	35,25	-
	34,79	-
	34,69	-
	34,86	-
	34,91	-
	35,17	-
	34,88	-
	34,75	-
	34,96	-
	35,16	-
	34,73	-
Ortalama	34,92	
Standart Sapma	0,18	

	HBV-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,13	-
	34,37	-
	34,15	-
	33,89	-
	33,96	-
	33,88	-
	33,91	-
	34,25	-
	33,78	-
	33,86	-
	33,89	-
	33,81	-
Ortalama	33,99	
Standart Sapma	0,19	

	TOXO-Prototip Sistem Floresan Yoğunluk Okumaları	Prototip Sistem Kalitatif Tanı
	34,15	-
	33,99	-
	33,87	-
	34,24	-
	33,87	-
	34,26	-
	34,01	-
	34,12	-
	34,04	-
	34,28	-
	34,18	-
	34,07	-
Ortalama	34,09	
Standart Sapma	0,14	