

REVIEW/DERLEME

## Maymun Çiçeği Virüsü'nün Real Time PCR (RT-PCR) İle Saptanması

### Real-Time PCR (RT-PCR) Detection of Monkeypox Virus

 Veysel Tahiroğlu<sup>1</sup>  Naci Ömer Alayunt<sup>2</sup>  Cihat Öztürk<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Şırnak Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Anabilim Dalı, Hemşirelik Bölümü, Şırnak, Türkiye

<sup>2</sup> Siirt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye

<sup>3</sup> Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırşehir, Türkiye

**Geliş Tarihi:** 06.07.2022 **Kabul Tarihi:** 25.11.2022

#### Öz

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), küçük DNA fragmanlarında belirli dizilerin hızlandırılmış amplifikasyonuna izin veren in vitro replikasyonudur. Hassas bir teknik olan PCR'nin, analiz edilecek kadar kopya üretmesi için yalnızca DNA izlerine ihtiyaç vardır. Moleküler tanı laboratuvarlarında, spesifik patojenlerin teşhisi için hedef RNA'ları bulmak için RT-PCR tekniği uygulanır. Bu teknik ile zoonoz olan Poxviridae ailesinden çift sarmallı bir DNA virüsü olan maymun çiçeği virüsü (MPXV) teşhisi sağlanabilir. RT-PCR tekniği ile analiz edilecek MPXV'nin yapısı nispeten büyüktür (200-250 nanometre). Poxvirüsler tuğla şeklindedir ve lineer çift sarmallı DNA genomuna sahip bir lipoprotein zarfı ile çevrilidir. mRNA translasyonu için konakçı ribozomlarının yanı sıra, poxvirüsler genomlarında gerekli tüm replikasyon, transkripsiyon, montaj ve çıkış proteinlerini içerir. Özgüllüğü yüksek ve duyarlılığı orta düzeyde olan rRT-PCR yöntemi MPXV için büyük bir umut kaynağı olabilir. MPXV teşhisi yapılırken real-time PCR (RT-PCR) analizinin ve benzer enfeksiyonları hızlı bir şekilde ayırt etmek için yeterli olup olmadığı konusunda yeni geliştirilen benzersiz hızlı testler ile yapılacak yeni analiz yöntemlerine ve yeni RT-PCR çalışmalarına ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Maymun Çiçeği, RT-PCR, DNA, İnsan, Test Kiti

**Sorumlu Yazar:** Dr. Öğr. Üyesi, Veysel Tahiroğlu, Şırnak Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Anabilim Dalı, Hemşirelik Bölümü, Şırnak Türkiye. **E mail:** veysel0793@hotmail.com **Telefon:** 0 486 216 8240/ 1182

**Nasıl Atıf Yapılmalı:** Tahirlioğlu V, Alayunt ÖN, Öztürk C. Maymun Çiçeği Virüsü'nün Real Time PCR (RT-PCR) İle Saptanması. Journal of Immunology and Clinical Microbiology 2022;7(3):67-73

©Copyright 2022 by the "International medical Education Library" The QMEL.org  
Journal of Immunology and Clinical Microbiology published by Cetus Publishing.



Journal of Immunology and Clinical Microbiology 2022 Open Access (<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jicm>)

Creative Commons Attribution Non-Commercial License: The articles in the Journal of Immunology and Clinical Microbiology are open access articles licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

## Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) is in vitro replication of small DNA fragments that allows for accelerated amplification of specific sequences. A sensitive technique, only DNA traces are needed for PCR to produce enough copies to be analyzed. In molecular diagnostic laboratories, RT-PCR technique is applied to find target RNAs for diagnosis of specific pathogens. With this technique, the diagnosis of Monkeypox Virus (MPXV), a double-stranded DNA virus from the zoonotic Poxviridae family, can be achieved. Poxviruses are brick-shaped and surrounded by a lipoprotein envelope with a linear double-stranded DNA genome. Besides host ribosomes for mRNA translation, poxviruses contain all essential replication, transcription, assembly and exit proteins in their genomes. The rRT-PCR method, which has high specificity and moderate sensitivity, can be a great source of hope for MPXV. We believe that when diagnosing MPXV, real-time PCR (RT-PCR) analysis and new RT-PCR studies are needed with newly developed unique rapid tests to determine whether it is sufficient to quickly distinguish similar infections.

**Keywords:** Monkeypox, RT-PCR, DNA , Human, Test Kit

## GİRİŞ

İnsan maymun çiçeği (MPXV), *Poxviridae* ailesinden çift sarmallı bir DNA virüsü olan MPXV bir zoonozdur(1). İlk olarak 1958'de tutsak primat döküntü örneklerinden izole edilen *orthopoxvirüs* MPXV çiçek hastalığının yok edilmesi kampanyasının yoğunlaştırılması sırasında 1970'de insan hastalığına neden olduğu kabul edildi(2-4). Maymun çiçeği semptomları arasında ateş, baş ve kas ağrısı, lenfadenopati ve sonunda kabuklanıp iyileşen papüller, veziküller ve püstüllere dönüşen karakteristik bir döküntü bulunur. MPXV, çiçek hastalığından (%30'a kadar) daha az sıklıkla ölümcüldür (vaka ölüm oranları <%1 ila %11 arasında değişir). MPXV, Sahra altı Afrika'da endemiktir, vahşi hayvanları enfekte eder ve zoonotik salgınlara neden olur(5). Egzotik hayvan ticareti ve uluslararası seyahat, durdurulan aşılama nedeniyle insan nüfusunun artan duyarlılığı ile birleştiğinde, MPXV'nin yeni alanlara yayılmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bu durumun küresel bir sağlık sorunu haline gelebileceği ve

MPXV'nin ciddi bir tehdit halini alarak pandemiye dönüşebileceği söylenmektedir (5). 2003 yılında ilk defa ABD'de salgının görüldüğü vakalar bildirildi(6). Son yıllarda sessizliğini koruyan virüs, ekim 2018'de Nijerya'dan İsrail'e seyahat eden bir yolcudaki yeniden rapor edildi(7). Mayıs 2019'da Nijerya'dan Singapur'a seyahat eden yine bir yolcudaki vaka meydana geldiği bildirildi(8). Mayıs 2021'de Nijerya'ya seyahat eden bir ailenin Birleşik Krallık'a döndükten sonra üç aile üyesinin de MPXV virüsü ile enfekte olduğu bildirilmiştir (9). Temmuz 2021'de Nijerya'dan Teksas'a seyahat eden başka bir yolcudaki ve kasım 2021'de Nijerya'dan Maryland'e seyahat eden bir başka yolcudaki vaka meydana geldiği rapor edilmiştir. Son olarak mayıs 2022 itibarıyla, Kanada'dan Massachusetts'e dönen bir yolcudaki MPXV vakası bildirilmiştir(10, 11).

Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) ile ilgili çalışmalar devam ederken, PCR ilk olarak 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir. Bu teknik, yüksek duyarlılığı ve özgülüğü ile tanı ve araştırma

olanaklarının gelişmesine öncülük etmiş ve Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür(12). PCR, küçük DNA fragmanlarında spesifik dizilerin hızlandırılmış amplifikasyonuna izin veren in vitro replikasyondur(13). PCR; Biyoteknoloji, hücre biyolojisi, genetik mühendisliği, adli bilimler, tıp bilimi, ilaç araştırmaları gibi çeşitli alanlarda uygulanmıştır. PCR'nin verimli performansı için yöntemler hassas bir şekilde optimize edilmiştir ve son otuz yılda önemli ölçüde iyileştirilmiştir(14). PCR'nin yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü; özellikle vücut sıvısı enfeksiyonlarında tanınan klinik uygulamalarda nadir görülen mikroorganizmaların saptanmasına olanak sağlar. Aynı zamanda bir numunedeki organizmaları kültürlenmeye kıyasla daha hızlı, daha ucuz ve daha doğru bir şekilde tespit eden bir yöntemdir. Son yıllarda idrar yolu enfeksiyonu semptomları olan hastalarda geleneksel idrar kültürüne göre daha fazla bakteriyi tanımlayan ve ayıran ve direkt idrar analizine olanak sağlayan multiple (multiplex) PCR tekniğinin uygulandığı gözlemlenmiştir(15). Hassas bir teknik olan PCR, analiz edilecek kadar kopya üretmek için yalnızca DNA veya RNA izlerine ihtiyaç duyar. PCR, periferik kan, deri, saç, tükürük ve mikroplar dahil olmak üzere çeşitli doku ve organizmalardan DNA elde edildikten sonra gerçekleştirilebilir(16). Bu çalışmada, yeniden ortaya çıkan bu İnsan maymun çiçeği virüsü (MPXV) hakkındaki mevcut bilgileri tekrar gözden geçirerek, yayılmasını ve patojenitesini hakkında mevcut stratejileri ve insan popülasyonu üzerindeki riskini değerlendiriyoruz ve PR-PCR yönteminin altın standart yöntem olduğunu destekler mahiyette bilgiler sunuyoruz.

### PCR Adımları

Şablon DNA, dört deoksiribonükleotit (dNTP'ler: dATP, dTTP, dGTP ve dCTP), iki primer veya oligonükleotit, DNA polimeraz enzimi, tampon solüsyonu ve polimeraz enzimi tarafından tanınmak üzere nükleotitlere entegre magnezyum ( $Mg^{+2}$ ), yeni iplik şablon DNA'dan yapılmıştır DNA şablonunun milyonlarca kopyasını kopyalamak için bir dizi ısı döngüsü kullanılır(17). Bu döngü temel olarak üç adımı içeren bir süreçtir: 1. Çift sarmallı DNA şablonunun denatürasyonu, 2. Hedefe özgü primerlerin bağlanması, 3. Bağlı primerlerin DNA polimeraz tarafından uzatılmasıdır(15). Yöntem, şablon DNA ve polimeraz tipine bağlı olarak 94°C-96°C arasında 1 dakika

ila 10 dakika arasında gerçekleştirilir. Bunu, tipik olarak 93°C-98°C arasındaki bir sıcaklıkta gerçekleştirilen denatürasyon aşaması takip eder. Çift sarmallı DNA'daki (dsDNA) hidrojen bağları kırılır, bu da her dsDNA'dan iki tek sarmallı DNA (ssDNA) molekülü ile sonuçlanır (denatürasyon aşaması). Bağlanma adımında, sıcaklık daha sonra 55°C ila 65°C aralığında primere özgü bağlanma sıcaklığına düşürülür, böylece primerler tek sarmallı DNA moleküllerinin tamamlayıcı dizilerine bağlanır. PCR karışımı daha sonra kullanılan polimeraza bağlı olarak 72°C-80°C arasında bir sıcaklığa ısıtılır. Uzatma aşaması sırasında, orijinal DNA şablonunun bir kopyası olan yeni çift sarmallı DNA'yı sentezleyen serbest dNTP'lerin varlığında, tamamlanmamış DNA dizisi polimeraz tarafından uzatılır(14).

### Real Time PCR

Günümüzde gerçek zamanlı PCR tercih edilen tekniktir(18). Yaklaşım niceldir çünkü RT-PCR, hedefin bir kalibratöre (qPCR) karşı ölçülmesine izin verir(19). qPCR, geleneksel PCR'nin daha gelişmiş bir şeklidir. Floresan boyalar kullanılarak ürünler, bu yaklaşımla reaksiyon döngüleri boyunca sürekli olarak izlenir. qPCR'nin floresan çıktı eğrisi, bilinen çeşitli DNA kopya numaralarıyla üretilen standart eğri ile karşılaştırılarak yapılabilir. Floresan sinyalinin eşiği geçmesi ve saptanması için gerekli olan döngü sayısı, eşik döngüsü (Ct) olarak bilinir. Ct seviyeleri, numunedeki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır(17). Real-time PCR, önceki prosedürlerden daha yüksek bir numune çıktısına sahiptir ve daha hassas ve seçicidir(18). qPCR, klinik ortamlarda yaygın olarak uygulanır ve halen nükleik asit ölçümü için altın standarttır(19). qPCR yaklaşımı, mükemmel duyarlılığı nedeniyle çeşitli hematolojik malignite formlarındaki malign hücreleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır(17).

### RT-PCR ve Maymun Çiçeği

PCR, kalitatif ve kantitatif sonuçlar verebilen oldukça hassas bir laboratuvar tekniği olarak kabul edilmekte, tıp ve biyoloji alanlarında güvenilirliği kanıtlanmıştır. Moleküler tanı laboratuvarlarında, spesifik patojenlerin tanısında hedef RNA'ları bulmak için rRT-PCR tekniği uygulanır(20). Guarner ve arkadaşlarının çayır köpeklerindeki MPXV belirlemek için yaptıkları moleküler çalışmalarda RT-PCR hassas olduğundan ve 4-10 DNA kopyasına kadar doğru şekilde

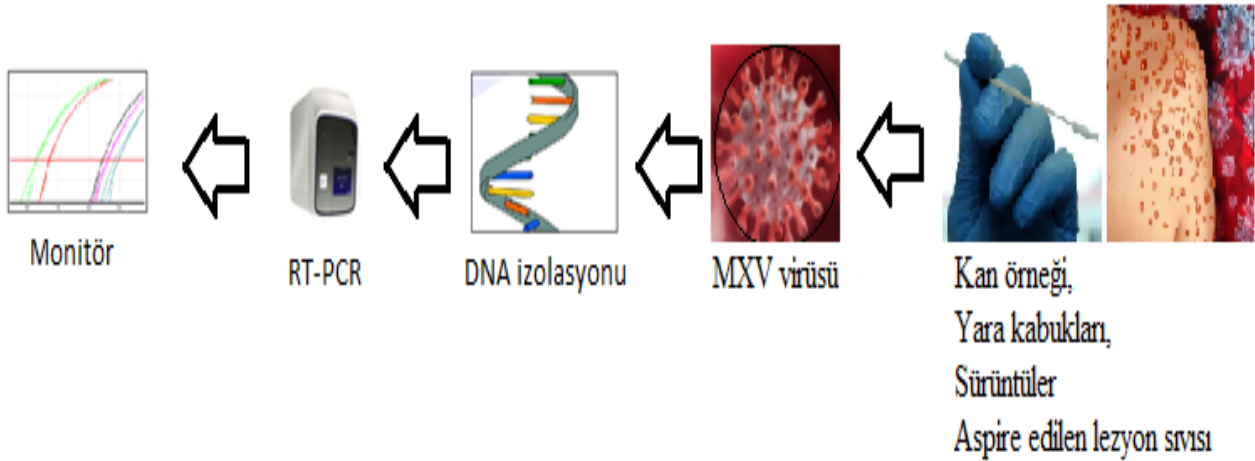
titre etmek için kullanılabildiğinden, RT-PCR MPXV viral DNA'sını tespit ettiğini rapor etmişlerdir(21). Spesifik primerler ve probalar kullanarak moleküler tanı için maymun çiçeği virüsünü diğer *Orthopoxvirüslerden* ayırt edebilen altın standart yöntem olabilir.

Özgüllüğü yüksek ancak duyarlılığı orta düzeyde olan rRT-PCR yöntemi, DSÖ tarafından yakın zamanda ortaya çıkan Covid-19 doğrulanması içinde altın standart test olarak kabul edildiği bilinmektedir. Ancak bu yöntem hakkında dikkate alınması gereken birçok olumsuz yorum bulunmaktadır (22). MPXV analiz edilirken bu sorunların dikkate alınması teşhisin hızlı ve doğru sonucunu etkiler(23). Preanalitik hatalara bakıldığında; Test sonuçları, numuneler laboratuvarında alınıp sonuçlandırılana kadar olan adımlar da etkilenebilir(24,25). Nükleik asit ekstraksiyonu, cDNA sentezi ve PCR işleme gibi analitik testler sırasındaki faktörler ve son olarak sonuçların yorumlanması ve analizi gibi analitik hatalar ve tahliller de rapor edilmiştir(23,24,26). Genel olarak, rRT-PCR sorun giderme analiz öncesi, analiz öncesi ve analiz sonrası aşamaları ve kılavuzları izleyerek, doğruluğunu ve kesinliğini etkin bir şekilde artırmak mümkündür. Örneğin litaretürde MPXV gerçek zamanlı PCR testlerinin doğrulanması için enfekte hücre kültüründen izole edilen bir MPXV ve diğer *ortopoksvirüs* DNA türleri paneli kullanıldı : 7 MPXV Kongo Havzası suşu ve 4 MPXV Batı Afrika suşu ve 6 diğer bilinen Avrasya suşu dahil *orthopoxvirüsler* ve 1 Kuzey Amerika *ortopoksvirüs* suşu kullanıldı. Karaciğer ve cilt dokuları, nazal ve oral sürüntüler, lezyonlar ve MPXV klinik numuneleri dahil olmak üzere MPXV ile enfekte olmuş hayvan modellerinden alınan çeşitli numune türleri de yeni tahlillerin sağlamlığının, özgüllüğünün ve duyarlılığının doğrulanması için kullanıldığı rapor edilmektedir(4,27,28).

### Analiz İçin Doğru Örnek Alımı

Su içeğinin en uygun ayırıcı tanı olduğu düşünüldüğünde, herpes virüslerini ortopoks virüslerinden ayırt etmek için geçmişte geleneksel olarak elektron mikroskobu kullanılmıştır. Şu anda, MPXV şüphesi olan cilt lezyonlarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Time-PCR) kullanılmaktadır. MPXV şüpheli cilt lezyonlarında tercihen yara kabukları,

sürüntüler ve aspire edilen lezyon sıvısı PCR için kullanılmalıdır. PCR için bu numuneler ve serolojik testler için kan ve serum örnekleri oda sıcaklığında taşınabilir; ancak doku biyopsileri kuru buz üzerinde donmuş olarak gönderilmelidir. Ayrıca, formalinle sabitlenmiş numuneler de oda sıcaklığında gönderilebilir (29). Kabuklardan, sürüntülerden ve aspire edilmiş lezyon sıvısı örneklerinden elde edilen sonuçlar, hem enfektivite hem de enfeksiyonun klinik seyrini değiştirebilir. Son zamanda yayılan maymun çiçeği virüsüne karşı Gerçek Zamanlı-PCR yaklaşımları, iki MPXV dizisini de ayırt edebilir. Yukarıda bahsi geçen seroloji, insan-patojen arasındaki immünolojik çapraz reaktivite nedeniyle sınırlı değere sahiptir. *Orthopoxviruses*, ancak aşılınmış bireylerde antikor yanıtını izlemek için kullanılır. Ancak iyi bir bağ kurmak için araştırmalar, IgM ve IgG tespiti bazı laboratuvarlarda yapmaya başlalar. İmmünohistokimya potansiyel olarak biyopsi örneklerinde antijenleri tanımlamak için kullanılır. Araştırmamızın temelini oluşturan MXV virüsünün RT-PCR ile erken tanısı ve tedavisi için lezyon tiplerine göre gerekirse kan, yara kabukları, sürüntüler ve aspire edilen lezyon sıvısı kullanılabilecektir.



**Şekil 1.** RT-PCR analiz aşamaları

### MPXV'in rRT-PCR Raporları

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 2003 salgını sırasında insan maymun çiçeği için vaka tanımlama kriterleri belirlendi. Popülasyonun enfekte memelilere veya insanlara potansiyel maruziyeti arttıkça epidemiyolojik kriterlerin özgülüğü azalır(30). Klinik ve epidemiyolojik kriterler gözden geçirilmeye devam etse ve duruma ve coğrafi konuma göre farklılık gösterebilse de, MPXV enfeksiyonunun doğrulanması laboratuvarkanı gerektirir(31). Monkeypox enfeksiyonu, viral kültürde izolasyon veya bir hasta örneğinden MPXV DNA'sı için PCR yoluyla doğrulanabilir. Alternatif olarak, bir hasta örneğinde *Orthopoxvirus* varlığını gösteren, hastanın aynı cinsten başka birine maruz kalmasını engelleyen testler, elektron mikroskopunda görselleştirme, *ortopoksvirüs* antijenleri için immünohistokimyasal boyama, *anti-orthopoxvirüs* IgM için serum çalışmaları (belirteç yakın zamanda maruz kalma) ve IgG (önceki maruz kalma veya aşılama) gösterir(32).

MPXV geleneksel olmayan MPXV endemik bölgelerinde ortaya çıkmıştır. 2003 yılında ABD'de maymun çiçeği salgınına bir MPXV Batı Afrika suşu neden oldu; insanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli türler enfekte olmuştur(33). Salgının kaynağı, MPXV ile enfekte Batı Afrika kemirgenlerinin ithalatına kadar izlenmiştir(34). 2005 yılında, hastalığın daha önce hiç rapor edilmediği Güney Sudan'da bir MPXV salgını rapor edildi(3). DNA dizi analizi bu son salgına MPXV Kongo Havzası benzeri bir suşun neden olduğunu öne sürdü. ABD Midwest ve Sudan'daki MPXV salgını,

virüsün yeni konakçılardan yararlanma ve küresel olarak hareket etme yeteneğini gösterdi. Son zamanlardaki MPXV salgınlarında, gerçek zamanlı PCR, hızlı, yüksek miktarda verim ve test formatının artan duyarlılığının avantajları nedeniyle MPXV enfeksiyonlarını/hastalığını teşhis etmek ve izlemek için kritik bir araç haline geldi. MPXV ile enfekte olmuş hayvan modeli çalışmalarında virüs bulaşmasını ve enfeksiyon seyrini incelemek için gerçek zamanlı PCR testi de kullanılmıştır. Maymun çiçeği virüsünü diğer *ortopoks* virüslerinden ayırt etmek için birkaç MPXV jenerik gerçek zamanlı PCR tahlili geliştirilmiştir(3,35,36).

### SONUÇ

Sürekli geliştirilen araç, gereç ve hazır kitlerle yenilenen PCR tabanlı yöntemler başlangıçta tanı amaçlı geliştirilmiş olsa da günümüzde birçok disiplinde ve alanda kullanılmaktadır. Optimize edilmesi için özel moleküler çalışanlar gerektiren PCR tabanlı yöntemler, laboratuvarlarda optimizasyon aşamalarına kadar zorluklara neden olmakta, zaman ve malzeme kaybına neden olabilmektedir. Optimize edilmiş literatür bilgileri kullanılarak tekrarlanan çalışmalarda bile, malzeme ve araçların markası, kullanım koşulları, yanlış kullanımları ve deneyimsiz personel ile tekrarlanan tepkiler aynı sonuçları vermeyebilir. Aynı cihaz ve markalarla bile farklı laboratuvarlar arasında deneyimli personel ile farklı sonuçlar alınmaktadır. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda bile, PCR tekniği dezavantajlarına ve zorluklarına rağmen tanısal mikrobiyoloji ve diğer alanlarda giderek daha önemli ve pratik bir teknik olmaya devam etmektedir.

Bu teknik, her geçen gün yenilenen PCR yöntemleri ile önümüzdeki yıllarda artan bir ivme ile gelişmeye devam edecektir. Maymun çiçeği virüsü MPXV ile ilgili mevcut literatürde, RT-PCR testlerine MPXV tanısında yüksek hassasiyet gösterse de, tek başına tanı için kullanmak yeterli değildir. Bununla beraber eş zamanlı olarak radyolojik bulgular ve biyokimyasal parametreler ile birlikte RT-PCR testleri eş zamanlı kullanılmalıdır. Yapılacak çalışmalar sonucunda geliştirilecek hızlı tanı test kitleleri ve onaylı RT-PCR raporlarına dayanarak MPXV virüsünün insandan insana yayılmasının önüne geçmek için ön teşhis ve tanı için RT-PCR bizler için umut verici altın standart analiz metodu olacaktır. Çalışmamız, MPXV virüsünün insandan insana geçme durumu veya pandemiye dönüşme ihtimalleri de göz önünde bulundurulduğunda erken tanının önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca tanı metodlarının henüz yaygınlaşmadığı ve literatürde henüz kanıta dayalı insan örneklerinde analizlere rastlanmadığı gözlemlenmiştir. Bu bağlamda yeni yeni yayılan bu virüse engel olmak için altın standart olabilecek RT-PCR metodu ve yapılması gerekenler bu çalışmanın gerekliliğini ortaya koymuştur. Yeni geliştirilecek özgün testlerle yapılacak RT-PCR çalışmalarına acil ihtiyaç olduğu tespit edilmiştir.

## BİLDİRİMLER

### Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

### Finansal Destek

Bu çalışma herhangi bir maddi destek almadığını beyan eder.

### Etik Onay

Bu çalışma bir derleme makalesi olduğundan etik kurul onayı gerekmemiştir ve bu çalışmanın yürütülmesinde Helsinki Bildirgesi kurallarına uyulmuştur.

### Yazar Katkıları

Fikir: VT, NÖA, CÖ, Tasarım: VT, NÖA , Gözetim: VT, CÖ, Araç gereç: VT, NÖA CÖ,Veri toplama ve işleme:VT, NÖA Analiz ve yorumlama:VT, NÖA Literatür tarama: VT, CÖ, Yazma: VT, Eleştirel inceleme: NÖA, CÖ

## KAYNAKÇA

- Petersen E, Kantele A, Koopmans M, et al. Human Monkeypox: Epidemiologic and Clinical Characteristics, Diagnosis, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(4):1027-1043.
- Reed KD, Melski JW, Graham MB, et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med.* 2004;350(4):342-350.
- Damon IK, Roth CE, Chowdhary V. Discovery of monkeypox in Sudan. *N Engl J Med.* 2006;355(9):962-963.
- Li Y, Olson VA, Laue T, Laker MT, Damon IK. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *J Clin Virol.* 2006;36(3):194-203.
- Kmiec D, Kirchhoff Monkeypox: A New Threat? *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(14):7866
- Kulesh DA, Loveless BM, Norwood D, ve ark. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Lab Invest.* 2004;84(9):1200-1208.
- Erez N, Achdout H, Milrot E, et al. Diagnosis of Imported Monkeypox. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(5):980-983.
- Yong SEF, Ng OT, Ho ZJM, et al. Imported Monkeypox, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(8):1826-1830.
- Hobson G, Adamson J, Adler H, et al. Family cluster of three cases of monkeypox imported from Nigeria to the United Kingdom. *Euro Surveill.* 2021;26(32):2100745.
- Rao AK, Schulte J, Chen TH, ve ark. Monkeypox Response Team. Monkeypox in a Traveler Returning from Nigeria - Dallas, MMWR *Morb Mortal Wkly Rep.* 2022;71(14):509-516.
- Costello V, Sowash M, Gaur A, et al. Imported Monkeypox from International Traveler, Maryland. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(5):1002-1005.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 1986;51(1): 263-273.
- Garcia LT, Cristancho LM, Vera EP, et al. A new multiplex-PCR for urinary tract pathogen detection using primer design based on an evolutionary computation method. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(10):1714-1727.

14. Sreejith KR, Ooi CH, Jin J, et al. Digital polymerase chain reaction technology - recent advances and future perspectives. *Lab Chip*. 2018;18(24):3717-3732.
15. Dixon M, Sha S, Stefil M, et al. Is it Time to Say Goodbye to Culture and Sensitivity? The Case for Culture-independent Urology. *Urology*. 2019;136:112-118.
16. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
17. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, et al. Digital PCR in myeloid malignancies: Ready to replace quantitative PCR? *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2249.
18. Kurkela S, Brown DWG. Molecular diagnostic techniques. *Medicine (Baltimore)*. 2009;37(10):535-540.
19. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. DPCR: A technology review. *Sensors (Switzerland)*. 2018;18(4):1271.
20. Mayer G, Muller J, Lunse CE. RNA diagnostics: real-time RT-PCR strategies and promising novel target RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2011;2(1):32-41.
21. Guarner J, Johnson BJ, Paddock CD, et al. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(3):426-431.
22. Alayunt NO. A brief history of RT-PCR and our laboratory experience with SARS-CoV-2 analyses using RT-PCR: RT-PCR and SARS-CoV-2. *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 2022;11(1). early edition. <https://doi.org/10.29238/teknolabjournal.v11i1.337>
23. Lippi G, Simundic AM., Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) *Clin. Chem. Lab. Med*. 2020;58(7):1070-1076.
24. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev*. 2006;19(1):165-256.
25. Lippi G, Meyer A, Cadamuro J, et al. European Federation of Clinical, P. Laboratory Medicine Working Group for Preanalytical, PREDICT: a checklist for preventing preanalytical diagnostic errors in clinical trials, *Clin. Chem. Lab Med*. 2020;58(4):518-526.
26. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, et al. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J. Clin. Microbiol*. 2020;58(6):e00512-20.
27. Ropp SL, Jin Q, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol*. 1995;33(8):2069-2076.
28. Esposito JJ, Knight JC. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*. 1985;143(1):230-251.
29. Robert Koch Institut (RKI). KL für Pockenviren - Präanalytikhandbuch. Berlin: RKI; 2020. Available at: <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/Konsiliar/Pockenviren/Praeanalytikhandbuch.pdf>. Erişim tarihi 30 Mayıs, 2022.
30. Hussey HS, Abdullahi LH, Collins JE, Muloiwa R, Hussey GD, Kagina BM. Varicella zoster virus-associated morbidity and mortality in Africa: a systematic review protocol. *BMJ Open*. 2016;6(4):e010213.
31. Osadebe L, Hughes CM, Shongo Lushima R, et al. Enhancing case definitions for surveillance of human monkeypox in the Democratic Republic of Congo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(9):e0005857.
32. McCollum AM, Damon IK. Human monkeypox. *Clin Infect Dis*. 2014;58(2):260-267.
33. C.L. Hutson, K.N. Lee, J. Abel, et al. Regnery Monkeypox zoonotic associations: insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2007;76(4):757-768.
34. K.D. Reed, J.W. Melski, M.B. Graham, et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere *N. Engl. J. Med*. 2004;350(4):342-350.
35. Kulesh DA, Loveless BM, Norwood D, et al. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Lab Invest*. 2004;84(9):1200-1208.
36. Olson VA, Laue T, Laker MT, et al. Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):1940-1946.