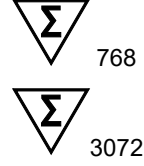


Temmuz 2021

artus[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Kullanım Talimatları (El Kitabı)



Sürüm 1

IVD

İn Vitro Tanı Amaçlı Kullanım İçindir

Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM ve ABI[®] 7500 Fast Dx cihazlarda kullanım için

CE

REF

4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R2

Sample to Insight



İçerik

Kullanım Amacı	4
Açıklama ve İlke	5
Patojen bilgileri.....	5
Özet ve açıklama	6
Sağlanan Materyaller.....	9
Kit içeriği.....	9
Kit bileşenleri.....	10
Platformlar ve yazılım.....	11
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller	12
Sarf Malzemeleri	12
Ekipman	12
Uyarılar ve Önlemler.....	13
Güvenlik bilgileri	13
Önlemler.....	14
Reaktif Saklama ve Kullanma.....	15
Numune Taşıma, Saklama ve Kullanma	15
Numune alma, taşıma ve saklama	15
Protokol: RGQ MDx 5plex HRM'de örnek hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması	16
Protokol: ABI 7500 Fast Dx'de Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması.....	22
Sonuçlar	26
Sonuçların Yorumlanması	28
Sınırlamalar	30

Performans.....	31
Analitik duyarlılık (Tespit sınırı)	31
Analitik özgüllük çalışmaları (Dahil olma ve münhasırlık/çapraz reaktivite).....	31
Olumsuz etkileyen maddeler	37
Kesinlik.....	38
Klinik Performans	39
Referanslar	43
Sorun Giderme Kılavuzu	44
Semboller	46
İletişim Bilgileri.....	47
Sipariş Bilgisi	48
Belge Revizyon Geçmişi.....	49

Kullanım Amacı

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, enfeksiyon belirti ve semptomları olan ya da COVID-19 enfeksiyonundan şüphelenilmesi için semptomlar veya başka nedenler bulunmayan kişilerden alınan nazofaringeal sürüntülerde (Nasopharyngeal Swabs, NPS), nazal sürüntülerde ve orofaringeal sürüntülerde SARS-CoV-2 kaynaklı nükleik asidin kalitatif saptaması için tasarlanan gerçek zamanlı bir RT-PCR testidir.

Enfeksiyonun akut fazında klinik gözlemler, hasta geçmişi ve epidemiyolojik bilgiler ile birlikte COVID-19 tanısında yardımcı olarak tasarlanmıştır.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit real-time PCR teknikleri ve *in vitro* diagnostik prosedürler konusunda özel eğitim almış klinik laboratuvar personeli gibi profesyonel kullanıcılar tarafından bir moleküler biyoloji laboratuvarı ortamında kullanıma yöneliktir.

Negatif sonuçlar, SARS-CoV-2 enfeksiyonunu olasılık dışı bırakmaz ve hasta yönetimi kararları için tek temel olarak kullanılmamalıdır.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, real-time PCR sistemleri olarak Rotor-Gene Q (RGQ) MDx Sistemi veya ABI 7500 Fast Dx ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Açıklama ve İlke

Patojen bilgileri

Coronaviridae familyasına ait bir cins olan koronavirüsler, insanlarda ve evcil hayvanlarda oldukça virülant hastalığa neden olan, büyük zarflı, pozitif iplikli RNA virüsleridir (1). İnsanları enfekte eden koronavirüslerin, soğuk algınlığı enfeksiyonlarının üçte birini oluşturduğu bilinmektedir ve bu virüsler, prematüre bebeklerde nozokomiyal üst solunum yolu enfeksiyonlarının iyi bilinen bir nedenidir (2).

Koronavirüs familyasının yeni bir üyesi, Çin'in Wuhan kentinde bir solunum yolu hastalığı salgınına neden olmuştur (1, 3). İlk olarak yeni tip koronavirüs (2019-nCoV) olarak adlandırılan SARS-CoV-2, 2003 salgınından sorumlu olan SARS-CoV (1, 3) ve 2012'den bu yana Orta Doğu'da dolaşımda olan MERS-CoV virüsünden farklıdır. SARS-CoV-2, COVID-19'un kaynak ajanıdır. SARS-CoV-2 RNA'sı, enfeksiyonun erken ve akut fazlarında çeşitli üst solunum yolu numunelerinden (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler) saptanabilir (3).

Hasta geçmişi ve SARS-CoV-2 epidemiyolojisi ile birleştirilen RT-PCR tahlilleri, SARS-CoV-2 tanısında altın standart haline gelmiştir. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC), enfeksiyon durumunu izlemek ve salgını kontrol altına almaya yönelik kısıtlayıcı önlemlerin etkinliğini değerlendirmek üzere RT-PCR temelli tahlillerin immünoassay'ler ile birlikte kullanımını önermiştir (4, 5).

SARS-CoV-2 Prep&Amp UM tahlili, aynı floresans kanalıyla saptanan 2 viral geni (N1 ve N2 genleri) hedeflemektedir. İki gen hedefi ayırt edilmemiştir ve gen hedeflerinin birinin veya her ikisinin amplifikasyonu bir floresans sinyaline neden olur. Pozitif sonuçlar SARS-CoV-2 virüsünün varlığına işaret eder ancak diğer patojenlerle koenfeksiyon olasılığını dışarıda bırakmaz. Diğer yandan, negatif RT-PCR sonuçları enfeksiyon olasılığını ortadan kaldırmaz.

Özet ve açıklama

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, basit bir örnek hazırlama adımının ardından RGQ MDx sistemi veya ABI 7500 Fast Dx platformlarında RT-PCR kullanılarak SARS-CoV-2 RNA'sının saptandığı kullanıma hazır bir sistem oluşturur (Şekil 1). SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 RNA genomunun 72 baz çiftli (bp) ve 67 bp bölgelerinin özel amplifikasyonu için ve RGQ MDx cihazlarının "Green" floresans kanalında ve ABI 7500 Fast Dx floresans filtresi A/1 ile doğrudan saptanmaları için reaktifler ve enzimler içerir.

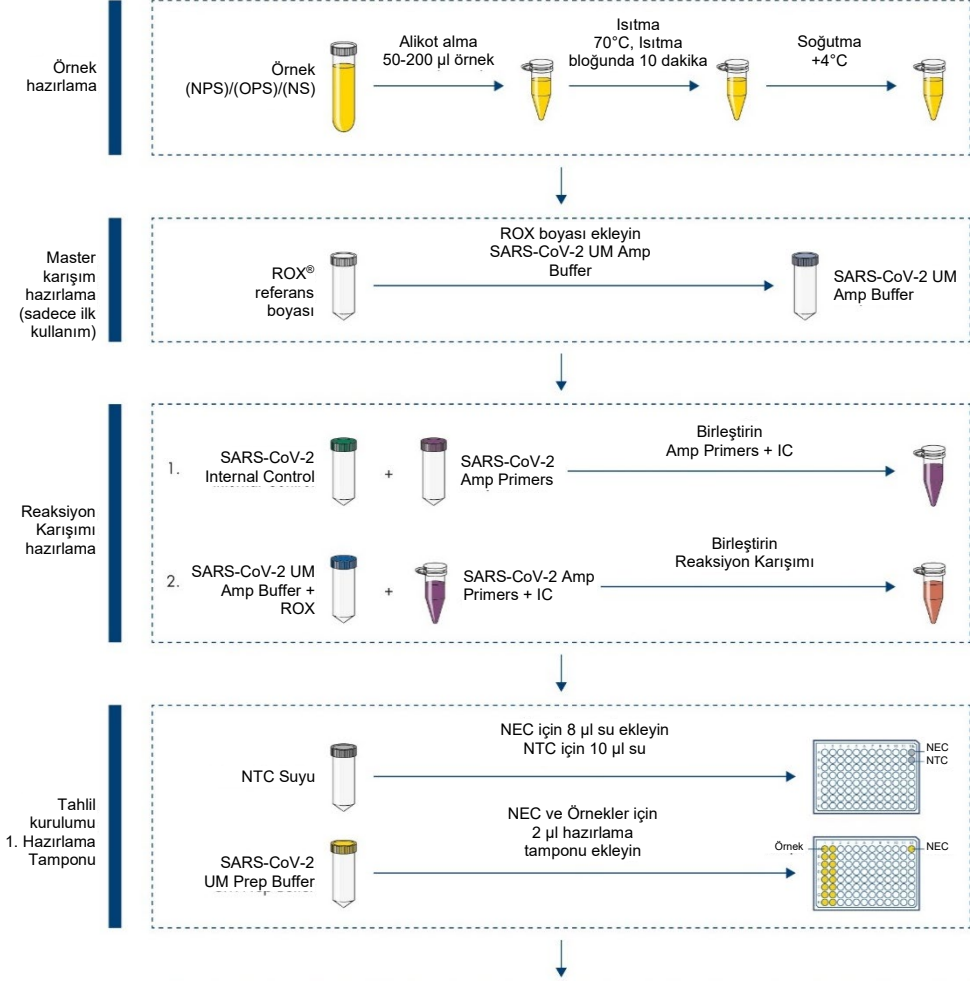
artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in Primer ve Prob Karışımı, RNaz P amplifikasyonları için gerekli oligonükleotidleri de içerir. RGQ MDx cihazının "Yellow" floresans kanalında veya ABI 7500 Fast Dx floresans filtresi B/2 ile saptandığında, bu amplikonlar sürüntüde yeterli biyolojik örnek alındığından emin olunmasını sağlar. Bu kontrol, SARS-CoV-2 negatif örneklerdeki biyolojik örneklerin varlığından emin olmak açısından kritik önem taşır. Amplifikasyon her zaman saptanabilir olmalıdır; aksi takdirde örnek kalitesini şüpheli hale getirir.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, olası RT-PCR inhibisyonunu ortaya çıkarmak için üçüncü bir heterolog amplifikasyon sistemi içerir. RGQ MDx cihazlarının "Red" floresans kanalında ve ABI 7500 Fast Dx floresans filtresi E/5 ile dahili RNA kontrolü (Internal Control, IC) olarak saptanır. IC, SARS-CoV-2 Amp Primers Mix'e dahil olduğundan, örnekte veya RT-PCR reaksiyonunda amplifikasyonu geciktiren veya engelleyen bir RT-PCR inhibitörü mevcut olmadığı sürece amplifikasyonu sabit olmalıdır.

PCR adımının performansını doğrulamak için *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'te harici pozitif ve negatif kontroller (sırasıyla SARS-CoV-2 Positive Control ve NTC olarak kullanılan nükleaz içermeyen su) tedarik edilir. Hazırlama tamponunda RT-PCR inhibitörlerinin yokluğunu doğrulamak için bir ekstraksiyonsuz kontrol (No Extraction Control, NEC) (NEC olarak SARS-CoV-2 UM Prep Buffer kullanılmıştır) kullanılması önemle tavsiye edilir.

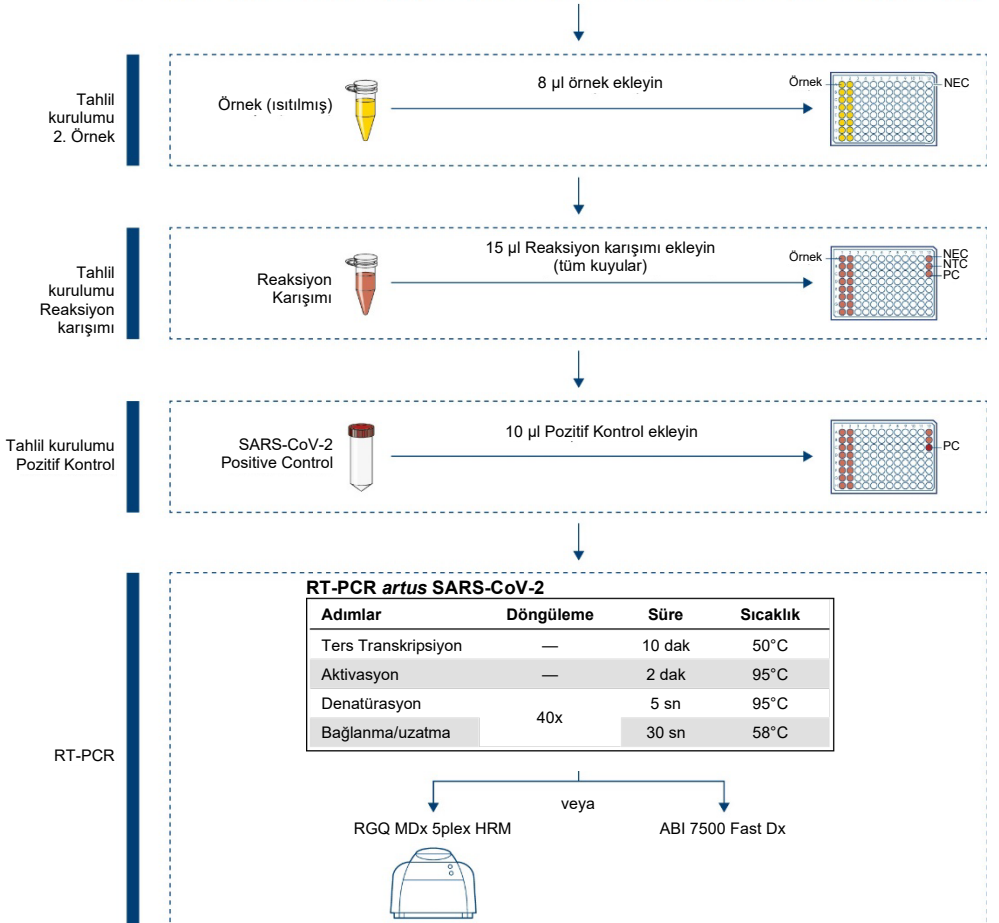
Birlikte ele alındığında, ters transkripsiyon ve PCR adımlarının etkililiği bu kontroller ile izlenir.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit İş Akışı



(Devamı bir sonraki sayfadadır)

(Bir önceki sayfadan devam etmektedir)



Şekil 1 *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit iş akışı

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit					
Katalog no.				4511460	4511469
Reaksiyon sayısı				768	3072
Tüp rengi	Kapak Rengi	Kimlik	Tüp Kimliği	Hacim (µl)	Hacim (µl)
Şeffaf	Sarı	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	Preparation Buffer (Hazırlama Tamponu)	2 x 930	8 x 930
Şeffaf	Mavi	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	Master Mix (Master Karışım)	4 x 1440	16 x 1440
Şeffaf	Mor	SARS-CoV-2 Amp Primers	Primers and Probes (Primerler ve Problar)	4 x 1680	16 x 1680
Şeffaf	Yeşil	SARS-CoV-2 Internal Control	Internal Control (IC) (Dahili Kontrol (IC))	1 x 1390	4 x 1390
Şeffaf	Kırmızı	SARS-CoV-2 Positive Control	Positive Control (Pozitif Kontrol)	1 x 220	4 x 220
Şeffaf	Şeffaf	Water for NTC (NTC Suyu)	Water (NTC) (Su (NTC))	1 x 1900	4 x 1900
Şeffaf	Şeffaf	ROX Reference Dye (ROX Referans Boyası)	ROX Dye (ROX Boyası)	1 x 210	4 x 210

Kit bileşenleri

Reaktifler

Her tüpte, reaktif hacimleri; bir pozitif kontrol (Positive Control, PC), bir şablonsuz kontrol (No Template Control, NTC) ve bir ekstraksiyonsuz kontrol (No Extraction Control, NEC) dahil 96 reaksiyondan oluşan 32 grup (3072 reaksiyon kiti için) veya 96 örnekten oluşan 8 grup (768 reaksiyon kiti için) için optimize edilmiştir.

Daha az veya daha çok sayıda örnek çalışılabilir ancak reaktif kullanımı optimum seviyenin altında olacaktır. Birden fazla dondurma-çözdürme döngüsünden kaçınmanız önerilir. Birden fazla dondurma-çözdürme döngüsünden kaçınmak için reaktifler alikotlara ayrılabilir.

Primerler ve proplar

SARS-CoV-2 sekanslarını hedefleyen primerler ve proplar, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından tasarlanan primerler ve proplara dayalıdır.

Kontroller ve kalibratörler

Tahlil, RT-PCR verimliliğini izlemek için 5 kontrol içerir.

Dahili kontrol (Internal Control, IC): Dahili kontrol, ters transkripsiyonu inhibe edebilecek kontaminantların varlığını doğrulayan bir tek iplikli IVT RNA'dır. Ayrıca dahili kontrol, şablonsuz kontrolde (No Template Control, NTC) ve ekstraksiyonsuz kontrolde (No Extraction Control, NEC) ters transkripsiyon etkililiğini izler.

Şablonsuz kontrol (No Template Control, NTC): Şablonsuz kontrol, nükleaz içermeyen sudan oluşur. PCR plaka hazırlama sırasında SARS-CoV-2 hedeflerinin yanlış yorumlanmasına yol açabilecek kontaminantların girişini doğrulamak için PCR plakasına eklenir.

Pozitif kontrol (Positive Control, PC): Pozitif kontrol SARS-CoV-2 Primerleri ve Probları (P&P karışımı) ile amplifiye edilmiş çift iplikli bir DNA'dır. Saptanması, PCR amplifikasyon adımıında yer alan reaktifin etkililiğini doğrular.

Ekstraksiyonsuz adım (No Extraction Control, NEC): Ekstraksiyonsuz kontrol, SARS-CoV-2 UM Prep Buffer'dan oluşur. Örnek hazırlama sırasında SARS-CoV-2 hedeflerinin yanlış yorumlanmasına yol açabilecek kontaminantların girişini doğrulamak için klinik örnekler paralel olarak işlenir.

Örnek Alma Kontrolü: Örnek Alma Kontrolü, RNaz P genini saptar ve SARS-CoV-2 negatif örneklerdeki biyolojik örneklerin varlığından emin olmak açısından kritik önem taşır. Örnek alma kontrolünün amplifikasyonu her zaman saptanabilir olmalıdır; aksi takdirde örnek kalitesini şüpheli hale getirir.

Platformlar ve yazılım

Kullanım öncesinde cihazların, üreticinin önerilerine göre bakımdan geçtiğinden ve kalibre edildiğinden emin olun. Bu kit, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM veya ABI 7500 Fast Dx cihazlarının ve uygun yazılımlarının kullanılmasını gerektiren iki iş akışında kullanılabilir:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.3.1 veya üzeri
- ABI 7500 Fast Dx: SDS yazılım sürümü 1.4.1 veya üzeri

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

Sarf Malzemeleri

- Tek kullanımlık pudrasız eldivenler
- Steril ve nükleaz içermeyen, filtreli pipet uçları
- 1,5 ml veya 2 ml PCR içermeyen tüpler
- Rotor-Gene® Q MDx ile kullanım için 0,1 ml'lik PCR tüpleri (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, kat. no. 981103)
- ABI 7500 Fast Dx qPCR platformu ile kullanım için 96 Kuyulu MicroAmp™ (Applied Biosystems 96 kuyulu plaka, kat. no. N8010560)
- ABI 7500 Fast Dx qPCR platformu ile kullanım için MicroAmp Optical Adhesive film (Applied Biosystems, kat. no. 4360954)

Ekipman*

- 2 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu masaüstü santrifüjü
- Pipetler (ayarlanabilir)
- Vorteks karıştırıcı
- Blok ısıtıcı
- Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.3.1 veya üzeri ile Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat. no. 9002032)
- Rotor-Disc 72 Rotor (kat.no. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (kat.no. 9018900)
- 72 kuyulu yükleme bloğu (QIAGEN loading block 72 x 0.1 ml tubes, kat. no 9018901)
- Alternatif olarak: Yazılım sürümü 1.4.1 veya üzeri ve 96 kuyulu plakalı santrifüj ile ABI 7500 Fast Dx qPCR platformu (Thermo Fisher Scientific®, kat. no 4406985)

* Kullanım öncesinde ve uygun olduğunda cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol edildiğinden ve kalibre edildiğinden emin olun.

Uyarılar ve Önlemler

Cihazla ilgili olarak meydana gelen ciddi olayları üreticiye ve kullanıcının ve/veya hastanın bulunduğu düzenleyici makama rapor etmek için yerel düzenlemelerinize başvurmanız gerekebileceğini lütfen dikkate alın.

Güvenlik bilgileri

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak kullanışlı ve kompakt bir PDF biçiminde mevcuttur.

Tek kullanımlık pudrasız eldivenler, laboratuvar önlüğü ve koruyucu gözlük dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere daima uygun kişisel koruyucu ekipman kullanın. Cildi, gözleri ve muköz membranları koruyun. Örnekleri kullanırken eldivenleri sık sık değiştirin.

Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır. İlgili kılavuzlarda açıklanan güvenlik önlemlerine daima uyun: Örneğin, Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guidelines* (M29) veya diğer ilgili belgeler.

Numuneler ve örnekler potansiyel olarak enfeksiyözdür. Örneği ve tahlil atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.

Önlemler

- Çalışma alanını temiz ve kontaminasyondan uzak tutmak için standart laboratuvar prosedürlerine uyun. RNA'yı manipüle etmek için özel ekipmanları olan bir alan ayırın.
- Çapraz kontaminasyonu en aza indirmek için iyi laboratuvar uygulamalarına uyun.
- Deney sırasında RNAz ile kontaminasyonu önlemeye dikkat edin ve RNAz içermeyen plastik malzemeler kullanın.
- Özellikle örnek tanımlaması için kayıtlarda iyi izlenebilirlik sağlandığından emin olun.

Reaktif Saklama ve Kullanma

Kutuda ve tüm bileşenlerin etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, 6 ay boyunca -30°C ila -15°C sıcaklıkta veya son kullanma tarihine kadar saklanabilir.

Numune Taşıma, Saklama ve Kullanma

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nazofaringeal, nazal ve orofaringeal sürüntüler ile kullanıma yöneliktir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) ve Public Health England, örnek alma, kullanma ve klinik numuneleri test etmeye yönelik yönergeler sağlamıştır. Ek bilgi için bu yönergelere ve diğer ilgili ulusal referans laboratuvar protokollerine başvurun.

Numune alma, taşıma ve saklama

Sürüntü numunesi alma, saklama ve taşıma için lütfen tedarikçinin önerilerine başvurun. Sürüntüler, numune bütünlüğünü korumak için taşıma besiyerine tamamen daldırılmış olmalıdır.

Protokol: RGQ MDx 5plex HRM'de örnek hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması

Bu protokol, RGQ MDx 5plex HRM'de, taşıma besiyerinde saklanan insan nazal, nazofaringeal veya orofaringeal sürüntülerinde SARS-CoV-2 hedeflerini saptama amaçlı örnek ve RT-PCR hazırlığını açıklamaktadır.

Başlamadan önce önemli noktalar

- Kutu ve tüm bileşen etiketlerinin üstünde basılı olan son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına uyulduğunu doğrulayın. Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.
- Bakımı iyi yapılmış ve kalibre edilmiş ekipmanları kullanın.
- Deney sırasında RNase ile kontaminasyondan kaçınmaya ve nükleaz içermeyen plastik malzemeler kullanmaya özen gösterin.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Örnekler hazırlama adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında saklanabilir; ancak buz üstünde veya 4°C'de soğutma rafında saklanması önerilir.
- Kullanımdan önce, SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, NTC için Su ve SARS-CoV-2 Positive Control'un oda sıcaklığında (15-25 °C) tamamen çözünmesini bekleyin. Tüpleri kullanıma kadar oda sıcaklığında ve ışıktan koruyarak saklayın.
- Kullanımdan önce, SARS-CoV-2 UM Prep Buffer ve SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı 2-3 kez ters çevirerek (vortekslemeyin) ve ardından hızlıca bir kez döndürerek homojen hale getirin. Diğer tüm reaktifler, 3-5 saniye puls vorteksleme ile veya 2-3 kez ters çevrilip ardından bir kez hızlıca döndürülerek homojen hale getirilebilir.
- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, saptama adımı için klinik örneklerde bulunan RNase'leri inhibe eder ancak virüs inaktive edici bir çözelti değildir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.

- qPCR platformunun döngüleme koşullarının bu protokolde belirtilen şekilde olduğunu doğrulayın.
- Birden fazla dondurma-çözdürme döngüsünden kaçınmak için reaktiflerden alikot alınabilir.
- Reaksiyon karışımını taze olarak hazırlayın (RT-PCR plaka başlangıcına <2 saat).
- Kontaminasyonu en aza indirmek için örnek ve RT-PCR hazırlama ayrı bölgelerde yapılmalıdır.

Prosedür

1. Örnek hazırlama

- 1a. Örneği içeren sürüntüyü kuvvetle vorteksleyin.
- 1b. 50-200 µl örnek alikotunu 1,5 ml PCR içermeyen tüpe alın
- 1c. Bir blok ısıtıcıda 70°C'de 10 dakika ısıtma adımını gerçekleştirin. Örnekleri buz üstünde en az 5 dakika boyunca soğutun, ardından örnekleri 4°C'de buz üstünde saklayın.

2. İlk kullanımda, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ROX referans boyası ile tamamlayın.

- 2a. 1 tüp SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'a 32,8 µl ROX boyası ekleyin.
- 2b. SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ve ROX boyasını içeren kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin.
- 2c. Tüpün dibinde ROX boyası içeren SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı döndürerek aşağı indirin.

3. Tam RGQ MDx plakası (72 kuyulu) için SARS-CoV-2 Amp Primers ile SARS-CoV-2 Internal Control için bir alikot karışımı hazırlayın.

- 3a. SARS-CoV-2 Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control'un gerekli hacimlerini Tablo 1'e göre yeni bir 1,5 mL'lik PCR'sız tüpe aktarın.
- 3b. Kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin veya tüpü 3-5 sn puls vorteksleyin.
- 3c. Tüpün dibinde IC içeren SARS-CoV-2 Amp Primers'i döndürerek aşağı indirin.

Tablo 1. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı kurulumu

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı				Reaksiyon sayısı Hacim (µl)
Reaktifler	Stok konsantrasyonu	Son konsantrasyonu	1 rxn	72 reaksiyon (+%22 ekstra hacim*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	638
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	132
Toplam SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı			8,75	770

* **Not:** SARS-CoV-2 UM Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control hacimlerini test edilecek örnek sayısına göre ayarlayın. Ölü hacmi telafi etmek için ekstra hacmi değerlendirin.

4. Tablo 2'ye göre bir reaksiyon karışımı hazırlayın ve iyice karıştırın.

Tablo 2. Reaksiyon karışımı kurulumu

RT-PCR reaksiyon karışımı				Reaksiyon sayısı Hacim (µl)
Reaktifler	Stok konsantrasyonu	Son konsantrasyonu	1 rxn	72 reaksiyon (+%20 ekstra hacim*)
SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†]	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2,9x	1x	8,75	756
Toplam reaksiyon hacmi		–	15,00	1296

* **Not:** SARS-CoV-2 UM Amp tamponu ve SARS-CoV-2 Amp Primers hacimlerini test edilecek örnek sayısına göre ayarlayın. Ölü hacmi telafi etmek için ekstra hacmi değerlendirin.

[†] ROX Reference Dye ile tamamlanan SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.

[‡] SARS-CoV-2 Internal Control ile tamamlanan SARS-CoV-2 Amp Primers.

5. 8 µl nükleaz içermeyen suyu NEC'ye atanan PCR tüpüne dağıtın.
6. 10 µl nükleaz içermeyen suyu NTC'ye atanan PCR tüpüne yükleyin.
7. 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer'ı NEC ve hazırlanan örneklerle atanan her bir PCR tüpüne dağıtın.
8. 8 µl hazırlanmış örneği SARS-CoV-2 UM Prep Buffer içeren bir PCR tüpüne ekleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.

9. Adım 4'te hazırlanan reaksiyon karışımından 15 µl'yi örneklerle ve kontrollere ayrılan tüplere ekleyin (Şekil 2 örnek olarak sunulmuştur). 5 kez yukarı aşağı pipetleme yaparak karıştırın, ardından SARS-CoV-2 Positive Control için ayrılan tüp hariç PCR tüpü kapaklarını kapatın.

Not: Çapraz kontaminasyonu önlemek için tüplerin iyice kapatıldığını doğrulayın.

10. 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control uygun PCR tüpüne yükleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.

11. RQG MDx 5plex HRM'nin RT-PCR programını Tablo 3'teki spesifikasyonlara göre ayarlayın.

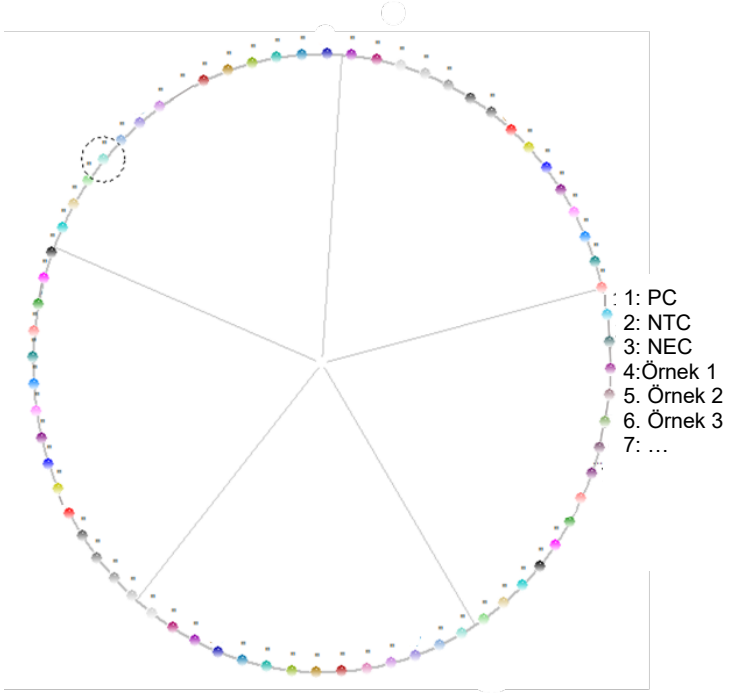
Not: Veri edinme, bağlanma/uzatma adımı sırasında gerçekleştirilmelidir.

12. Tüpleri gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirin (tüp düzeni örneği Şekil 2'de gösterilmektedir) ve Tablo 3'te açıklanan şekilde döngüleme programını başlatın.

Not: Tahlil kurulumu ve gerçek zamanlı döngüleyici adımları arasında aynı tüp pozisyonu ve sırasını izlemeye dikkat edin.

Tablo 3. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM programı

Adımlar	Süre	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Acquisition (Edinim)
Ters Transkripsiyon	10 dak	50	1	Hayır
PCR ilk ısı aktivasyonu	2 dak	95	1	Hayır
2 adımlı döngüleme				
Denatürasyon	5 sn	95	40	Hayır
Birleştirme/Uzatma	30 sn	58		Green (FAM), Yellow (HEX) ve Red (Atto)



Şekil 2. RGQ MDx 5plex HRM platformunda tüp düzeni örneği

13. "New Run Wizard" (Yeni Çalışma Sihirbazı) içinde **Gain optimization** (Optimizasyon sağla) ögesine tıklayın ve **Auto-gain Optimization Setup** (Otomatik Kazanç Optimizasyon Kurulumu) ögesini açın.
14. Edinim kanallarının Tablo 4'te açıklanan şekilde ayarlandığını doğrulayın.

Tablo 4. RGQ MDx 5plex HRM yapılandırması

Ad	PC tüp konumu	Min. okuma (FI)	Maks. okuma (FI)	Min. kazanç	Maks. kazanç
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

* Not: SARS-CoV-2 Positive Control tüpü konumuna göre değiştirilmesi gerekir.

15. **Perform optimization before the first acquisition** (İlk edinimden önce optimizasyon gerçekleştir) ögesini seçin.

16. Çalışmayı başlatın.

17. Çalışmanın sonunda sonuçları analiz edin (bkz. Sonuçlar bölümü).

Protokol: ABI 7500 Fast Dx'de Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması

Bu protokol, ABI 7500 Fast Dx qPCR cihazında taşıma besiyerinde saklanan insan nazal, nazofaringeal veya orofaringeal sürüntülerinde SARS-CoV-2 hedeflerinin hazırlanması ve saptanmasına yöneliktir.

Başlamadan önce önemli noktalar

- Kutu ve tüm bileşen etiketlerinin üstünde basılı olan son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına uyulduğunu doğrulayın. Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.
- Bakımı iyi yapılmış ve kalibre edilmiş ekipmanları kullanın.
- Deney sırasında RNase ile kontaminasyondan kaçınmaya ve nükleaz içermeyen plastik malzemeler kullanmaya özen gösterin.
- ABI 7500 Fast Dx kullanırken, ilk kullanımdan önce master karışım tüpüne ROX Boyası eklenmelidir.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Örnekler hazırlama adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında saklanabilir; ancak buz üstünde veya 4°C'de soğutma rafında saklanması önerilir.
- ABI 7500 Fast Dx kullanılırken ROX boyası gereklidir.
- **Veriler, ROX pasif boya ayarı ile edinilmelidir.**
- Kullanımdan önce, SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, NTC için Su ve SARS-CoV-2 Positive Control'un oda sıcaklığında (15-25 °C) tamamen çözünmesini bekleyin. Tüpleri kullanıma kadar oda sıcaklığında ve ışıktan koruyarak saklayın.
- Kullanımdan önce, SARS-CoV-2 UM Prep Buffer ve SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı 2-3 kez ters çevirerek (vortekslemeyin) ve ardından hızlıca bir kez döndürerek homojen hale getirin. Diğer tüm reaktifler, 3-5 saniye puls vorteksleme ile veya 2-3 kez ters çevrilip ardından bir kez hızlıca döndürülerek homojen hale getirilebilir.

- SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, saptama adımı için klinik örneklerde bulunan RNase'leri inhibe eder ancak virüs inaktive edici bir çözeltili değildir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.
- qPCR platformunun döngüleme koşullarının bu protokolda belirtilen şekilde olduğunu doğrulayın.
- Birden fazla dondurma-çözdürme döngüsünden kaçınmak için reaktiflerden alikot alınabilir.
- Reaksiyon karışımını taze olarak hazırlayın (RT-PCR plaka başlangıcına <2 saat).
- Kontaminasyonu en aza indirmek için örnek ve RT-PCR hazırlama ayrı bölgelerde yapılmalıdır.

Prosedür

1. Örnek hazırlama

- a. Örneği içeren sürüntüyü kuvvetle vorteksleyin.
- b. 50-200 µl örnek alikotunu 1,5 ml PCR içermeyen tüpe alın.
- c. Bir blok ısıtıcıda 70°C'de 10 dakika boyunca bir ısıtma adımı gerçekleştirin. Örnekleri buz üstünde en az 5 dakika boyunca soğutun, ardından örnekleri 4°C'de buz üstünde saklayın.

2. İlk kullanımda, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ROX Referans Boyası ile tamamlayın.

- a. Bir tüp SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'a 32,8 µl ROX Boyası ekleyin.
- b. SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ve ROX Boyasını içeren kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin.
- c. Tüpün dibinde ROX Boyası içeren SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı döndürerek aşağı indirin.

3. Tam ABI 7500 Fast Dx plakası (96 kuyulu) için SARS-CoV-2 Amp Primers ile SARS-CoV-2 Internal Control için bir alikot karışımı hazırlayın.

- a. Tablo 5'e göre gerekli hacimde SARS-CoV-2 Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control yeni bir 1,5 ml PCR içermeyen tüpe aktarın.
- b. Kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin veya tüpü 3-5 sn puls vorteksleyin.
- c. Çözeltiyi tüpün dibine getirmek için IC'yi içeren SARS-CoV-2 Amp Primers'ı aşağı doğru döndürün.

Tablo 5. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı kurulumu

SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı				Reaksiyon sayısı Hacim (µl)
Reaktifler	Stok konsantrasyonu	Son konsantrasyonu	1 rxn	96 reaksiyon (+%21 ekstra hacim*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	841
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	174
Toplam SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı			8,75	1015

* **Not:** SARS-CoV-2 UM Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control hacimlerini test edilecek örnek sayısına göre ayarlayın. Ölü hacmi telafi etmek için ekstra hacmi değerlendirin.

4. Tablo 6'ye göre bir reaksiyon karışımı hazırlayın ve iyice karıştırın.

Tablo 6. Reaksiyon karışımı kurulumu

RT-PCR reaksiyon karışımı				Reaksiyon sayısı Hacim (µl)
Reaktifler	Stok konsantrasyonu	Son konsantrasyonu	1 rxn	96 reaksiyon (+%20 ekstra hacim*)
SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†]	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2,9x	1x	8,75	1008
Toplam reaksiyon hacmi		–	15,00	1728

* **Not:** SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ve SARS-CoV-2 Amp Primers hacmini test edilecek örnek sayısına göre ayarlayın. Ölü hacmi telafi etmek için ekstra hacmi değerlendirin.

[†] ROX Referans Boyası ile tamamlanan SARS-CoV-2 UM Amp Buffer

[‡] SARS-CoV-2 Internal Control ile tamamlanan SARS-CoV-2 Amp Primers

- 8 µl nükleaz içermeyen suyu NEC'ye atanan kuyuya dağıtın.
- 10 µl nükleaz içermeyen suyu NTC'ye atanan kuyuya yükleyin.
- 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer'ı NEC'ye atanan her kuyuya ve hazırlanan örneklerle dağıtın.
- 8 µl hazırlanmış örneği SARS-CoV-2 UM Prep Buffer'ı içeren bir kuyuya ekleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
- Adım 4'te hazırlanan reaksiyon karışımının 15 µl'sini örneklerle ve kontrollere ayrılan kuyulara ekleyin (Şekil 3'teki örneğe bakın). Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
- 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control uygun kuyuya yükleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.

11. Çapraz kontaminasyonu önlemek için PCR plakasını iyice kapatın. Aynı kuyularda sıkı bir mühür elde etmek için tüm plakaya homojen şekilde basınç uyguladığınızdan emin olun.
12. Sıvıyı kuyunun alt kısmında toplamak için PCR plakasını kısa süre santrifüjleyin.
13. RT-PCR programını Tablo 7'ye göre ABI 7500 Fast Dx "Standard 7500" (Standart 7500) Çalışma Moduna ayarlayın.
Not: Veri edinme, bağlanma/uzatma adımı sırasında gerçekleştirilmelidir.
Not: Lütfen daha ayrıntılı bilgi için *ABI 7500 Fast Dx Kullanım Talimatları* belgesine bakın.
14. Plakayı gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirin (PCR plaka yerleşiminin bir örneği Şekil 3'te sunulmuştur) ve Tablo 7'de açıklandığı şekilde döngüleme programını başlatın.
15. Kullanılan kuyuları seçin ve FAM, VIC ve Cy5 habercilerini uygulayın. Veriler, ROX pasif boya **ON** (AÇIK) ile edinilmelidir.
16. ABI 7500 Fast Dx Standart Eğrisinin Mutlak Kantifikasyon olarak yapılandırıldığını doğrulayın.
17. Çalışmayı başlatın.
18. Çalışmanın sonunda sonuçları analiz edin (bkz. Sonuçlar bölümü).

Tablo 7. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM programı

Adımlar	Süre	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Acquisition (Edinim)
Ters Transkripsiyon	10 dak	50	1	Hayır
PCR ilk ısı aktivasyonu	2 dak	95	1	Hayır
2 adımlı döngüleme				
Denatürasyon	5 sn	95	40	Hayır
Birleştirme/Uzatma	30 sn	58		Green (FAM), Yellow (VIC) ve Red (Cy5)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	NTC											
C	NEC											
D	Sample 1											
E	Sample 2											
F	Sample 3											
G	...											
H												

Şekil 3. ABI 7500 Fast Dx'de plaka düzeni örneği

Sonuçlar

RGQ MDx 5plex HRM'de veriler, üreticinin talimatlarına göre Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.3.1 (veya üzeri) ile analiz edilir (Rotor-Gene Q MDx Kullanım Kılavuzu, Revizyon 7, Eylül 2018). Aşağıdaki analiz parametreleri, farklı analizler arasında tutarlılık için gereklidir (Tablo 8).

Tablo 8. RGQ MDx 5plex HRM için analiz parametreleri

Kanallar	Green	Red	Yellow
Floresans eşiği	0,03	0,03	0,03
Eğim düzeltmesi	Evet	Evet	Evet
Dinamik tüp	Evet	Evet	Evet
Hareket noktası	Hayır	10-20	10-20
Aykırı Değer Kaldırma: Reaksiyon Etkinliği Eşiği	Evet Etkin %0	Hayır	Hayır
Kırılmış başlangıç döngüleri	5	5	5
Kesme döngüleri	Ct >38,00, 40,00 olarak kabul edilir	Hayır	Ct >35,00, 40,00 olarak kabul edilir

RGQ yazılımında çalışma sonuçları, analiz sırasında açılan kantitasyon sonuçları gridinde mevcuttur. Seçilen örneklerden elde edilen veriler, tabloda özetlenmiştir ve grid içine fare düğmesiyle sağ tıklayıp Export to Excel (Excel'e Aktar) ögesi seçilerek Excel® dosyası olarak dışa aktarılabilir. Sonuçları dışa aktarmadan önce tüm örneklerin seçildiğinden emin olun.

ABI'de veriler, üreticinin talimatlarına göre 7500 Fast Sistem Yazılımı sürüm 1.4.1 (veya üzeri) ile analiz edilir. Aşağıdaki parametreler, farklı analizler arasında tutarlılık için gereklidir (Tablo 9).

Tablo 9. ABI 7500 Fast Dx için analiz parametreleri

Kanallar	FAM*	VIC/HEX*	Cy5/Atto*
Pasif boya	ROX	ROX	ROX
Floresans eşiği	0,13	0,05	0,025
Referans çizgi	Otomatik	Otomatik	Otomatik
Kesme döngüleri	Ct >39,00, 40,00 olarak kabul edilir	Hayır	Ct >35,00, 40,00 olarak kabul edilir

* FAM = ABI platformunda Filtre A/1, VIC/HEX = ABI platformunda Filtre B/2, Cy5/Atto = ABI platformunda Filtre E/5

ABI SDS yazılımında, seçilen kuyu grubunun veya tüm plakanın Ct değerleri **Results** (Sonuçlar) ana bölümünün **Report** (Rapor) sayfasında mevcuttur. Veriler, virgülle ayrılan değer metni (.csv) formatında (önerilen) dışa aktarılabilir: SDS Yazılımı penceresinde **File** (Dosya) > **Export** (Dışa Aktar) > **Results** (Sonuçlar) öğesini seçin (menü öğesi **Ct** de seçilebilir). Dışa aktarılan dosyanın formatını .csv olarak seçin.

Sonuçların Yorumlanması

Pozitif kontrol (Positive Control, PC), N1 ve N2 genleri, RGQ MDx 5plex HRM ile Green floresans kanalında (veya ABI'de floresan FAM kanalında) saptanır.

RNAz P'den oluşan örnekleme kontrolü, RGQ MDx 5plex HRM ile Yellow floresans kanalında (veya ABI ile VIC/HEX floresans kanalında) saptanır. Her klinik örnek, örnekleme kontrolü amplifikasyonu göstermelidir. PC'de, insan sekanslarının yokluğuna rağmen sarı bir amplifikasyon görülebilir. Bu durumda, PC sarı kanalındaki bir sinyal göz ardı edilebilir çünkü yeşil kanaldaki güçlü floresans sinyali sarı kanala taşabilir.

Dahili kontrol (Internal Control, IC), SARS-CoV-2 Amp Primers'e dahil edilir. Şablonsuz kontrolde (No Template Control, NTC), ekstraksiyonsuz kontrolde (No Extraction Control, NEC), pozitif kontrolde (Positive Control, PC) ve RGQ MDx 5plex HRM ile Red floresans kanalıyla (veya ABI ile Cy5/Atto floresans kanalıyla) klinik örneklerde saptanır.

RT-PCR çalışmalarını doğrulamak için PC, NTC ve NEC kontrolleri beklendiği şekilde amplifiye olmalı ve saptanmalıdır.

Tablo 10. RGQ MDx 5plex HRM için çalışma validite kriterleri ve sonuç yorumlama

Kontrol	Green kanalda saptama	Yellow kanalda saptama	Red kanalda saptama	Yorumlama
Pozitif kontrol (PC)	Ct ≤ 38,00	İndiferant	İndiferant	Çalışma geçerlidir.
	Ct > 38,00 veya Ct yok	İndiferant	İndiferant	Çalışma geçersizdir.
Şablonsuz kontrol (NTC) veya ekstraksiyonsuz kontrol (NEC)	Ct > 38,00 veya Ct yok	Ct > 35,00 veya Ct yok	Evet	Çalışma geçerlidir.
	Yeşil veya sarıda amplifikasyon ile diğer kombinasyonlar		İndiferant	Çalışma geçersizdir.

Tablo 11. ABI 7500 Fast Dx için çalışma validite kriterleri ve sonuç yorumlama

Kontrol	FAM boyasında saptama*	VIC/HEX boyasında saptama*	Cy5/Atto boyasında saptama*	Yorumlama
Pozitif kontrol (PC)	Ct ≤ 39,00	İndiferant	İndiferant	Çalışma geçerlidir.
	Ct > 39,00 veya Ct yok	İndiferant	İndiferant	Çalışma geçersizdir.
Şablonsuz kontrol (NTC) veya ekstraksiyonsuz kontrol (NEC)	Ct > 39,00 veya Ct yok	Ct > 35,00 veya Ct yok	Evet	Çalışma geçerlidir.
	FAM veya VIC/HEX içinde amplifikasyon ile başka herhangi bir kombinasyon		İndiferant	Çalışma geçersizdir.

* FAM = ABI platformunda Filtre A/1, VIC/HEX = ABI platformunda Filtre B/2, Cy5/Atto = ABI platformunda Filtre E/5

Test edilen örnekleri doğrulamak için örnekler beklenen şekilde amplifiye edilmeli ve saptanmalıdır.

Tablo 12. RGQ MDx 5plex HRM için örnek validite kriterleri ve sonuç yorumlama

Green kanalda saptama	Yellow kanalda saptama	Red kanalda saptama	Yorumlama
Ct ≤ 38,00	İndiferant	İndiferant	Örnek, SARS-CoV-2 RNA'sı bakımından pozitifdir.
Ct > 38,00 veya Ct yok	Ct ≤ 35,00	İndiferant	Örnek negatifdir, SARS-CoV-2 RNA'sı saptanmamıştır.
Ct > 38,00 veya Ct yok	Ct > 35,00 veya Ct yok	Evet	Geçersiz örnek. İnsan materyali saptanmadı veya yetersiz miktarda saptandı. Yeniden örnek alma gereklidir.
Ct > 38,00 veya Ct yok	Ct > 35,00 veya Ct yok	Hayır	Geçersiz örnek. RT-qPCR reaksiyonu inhibe edilir. Tekrar test gereklidir.

Tablo 13. ABI 7500 Fast Dx için örnek validite kriterleri ve sonuç yorumlama

FAM boyasında saptama*	VIC/HEX boyasında saptama*	Cy5/Atto boyasında saptama*	Yorumlama
Ct ≤ 39,00	İndiferant	İndiferant	Örnek pozitifdir.
Ct > 39,00 veya Ct yok	Ct ≤ 35,00	İndiferant	Örnek negatifdir, SARS-CoV-2 saptanmamıştır.
Ct > 39,00 veya Ct yok	Ct > 35,00 veya Ct yok	Evet	Geçersiz örnek. İnsan materyali saptanmamıştır. Yeniden örnek alma gereklidir.
Ct > 39,00 veya Ct yok	Ct > 35,00 veya Ct yok	Hayır	Geçersiz örnek. RT-qPCR reaksiyonu inhibe edilir. Tekrar test gereklidir.

* FAM = ABI platformunda Filtre A/1, VIC/HEX = ABI platformunda Filtre B/2, Cy5/Atto = ABI platformunda Filtre E/5

Sınırlamalar

- Sadece *in vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.
- *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'ten alınan sonuçların tanı, tedavi veya diğer hasta yönetimi kararlarında tek başına temel alınması amaçlanmamıştır. Negatif sonuçlar, SARS-CoV-2 enfeksiyonunu olasılık dışında bırakmaz ve hasta tedavisi kararında tek başına temel alınmamalıdır.
- Ürün özellikle *in vitro* diagnostik prosedürler konusunda talimat ve eğitim almış personel tarafından kullanıma yöneliktir.
- Optimum PCR sonuçları elde etmek için qPCR platformunun kullanım kılavuzuna (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx veya ABI 7500 Fast Dx) harfiyen uyulması gerekir.
- Tüm bileşenlerin etiketleri ve kutusunda basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Performans

Analitik duyarlılık (Tespit sınırı)

Analitik duyarlılık veya tespit sınırı, test edilen örneklerin ≥ 95 'inin pozitif sonuç oluşturduğu en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır.

LoD, ticari tedarikçilerden (ZeptoMetrix®) alınan inaktif viral partiküllerin yüksek titreli stoklarıyla hazırlanan negatif nazofaringeal örneklerin seri dilüsyonları analiz edilerek değerlendirilmiştir. Elde edilen LoD konsantrasyonunu onaylamak için, tüm tekrarların tespit oranı ≥ 95 olmalıdır (tekrarların en az 19/20'si pozitif sinyal üretmelidir). LoD konsantrasyonu iki farklı reaktif lotu kullanılarak her iki real-time PCR platformunda doğrulanmıştır.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit için her iki real-time PCR platformunda öne sürülen tespit sınırı 950 cp/ml'dir.

Analitik özgüllük çalışmaları (Dahil olma ve münhasırlık/çapraz reaktivite)

Dahil olma

artus SARS-CoV-2 Amp Primerleri ve Problarının dahil olma değeri, GISAID veri tabanında (www.gisaid.org) bulunan sekanslar üzerinde *in silico* analiz yapılarak değerlendirilmiştir. Toplam 722.488 sekans (23/03/2021 tarihinde kullanıma girmiştir) COVID CG (<https://covidcg.org>) üzerinde analiz edilmiş olup GISAID meta verileri ile desteklenmiştir. Sekanslar WIV04 referans sekansı (poli-A kuyruğunun uzunluğu hariç olmak üzere Wuhan-Hu-1/NC_045512.2 ile %100 aynı) ile uyumlu hale getirilmiş ve tek nükleotid varyasyonları (Single Nucleotide Variation, SNV), *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Primerleri ve Problarının hedeflediği genomik bölgede analiz edilmiştir. Tanımlanan SNV'lerin prevalansı ve ayrıca eş zamanlı gerçekleşen mutasyonların sıklığı %1'in altında kalmıştır. İlgili nükleotidlerdeki 3' ucundan son 1 ila 3 nükleotidde SNV bulunmamıştır. SNV bulunmasının performansı etkilemesi beklenir. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in, yayınlanan sekansların %100'ünü saptayabildiği kabul edilmiştir.

Münhasırlık/Çapraz reaktivite

İn siliko analiz

artus SARS-CoV-2 Amp Primerleri ve Problarının münhasırlığı, NCBI veri bankasında saklanan sekanslar üzerinde *in siliko* analiz yapılarak değerlendirilmiştir. *In siliko* analiz, test edilen patojenlerden bazılarının, *artus* SARS-CoV-2 primerleri veya problemlerinden biriyle %80'in üzerinde homolojiye sahip olduğunu göstermiştir. Bunlar arasında *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus salivarius* yer almaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*, SARS-CoV-2 tahlilinin primerleri/problemlerinden biriyle %80'in altında homolojiye sahip olmuştur. Bununla birlikte, *artus* SARS-CoV-2 Amp Primerleri ve Problemleri, NCBI nr/nt veri tabanında saklanan farklı sekanslar ile hiçbir olası amplifikasyon göstermemiştir.

In siliko PCR ile, 500 bp sınırlı potansiyel ampikon boyutuna sahip toplam 36 bakteriyel, viral ve fungal suş analiz edilmiştir. Patojen sekansları NCBI veri tabanından alınmıştır ancak bu patojenlerden hiçbiri *in siliko* amplifikasyon göstermemiştir.

Tablo 14. İn siliko test edilen patojenlerin listesi.

Patojenler	Suş/Tip	Taksonomi Kimliği	İn siliko PCR sonuçları
<i>Adenovirus Tip 3</i>	Tip 3	45659	Eşleşme yok
<i>Adenovirus Tip 4</i>	Tip 4	28280	Eşleşme yok
<i>Adenovirus Tip 5</i>	Tip 5	28285	Eşleşme yok
<i>Adenovirus Tip 7A</i>	Tip 7A	85755	Eşleşme yok
<i>Adenovirus Tip 14</i>	Tip 14	10521	Eşleşme yok
<i>Adenovirus Tip 31</i>	Tip 31	10529	Eşleşme yok
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Eşleşme yok
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Olası amplifikasyon yok*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Eşleşme yok
Enterovirus	Tip 68	42789	Eşleşme yok

* Primerler/problemlerden biriyle sekans eşleşmesi <%80 homoloji göstermiştir.

† Primerler/problemlerden biriyle sekans eşleşmesi ≥%80 homoloji göstermiştir.

(Devamı bir sonraki sayfadır)

Tablo 14 (Bir önceki sayfadan devam etmektedir)

Patojenler	Suş/Tip	Taksonomi Kimliği	<i>In silico</i> PCR sonuçları
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Eşleşme yok
İnsan koronavirüsü	229E	11137	Eşleşme yok
İnsan koronavirüsü	NL63	277944	Eşleşme yok
İnsan koronavirüsü	HKU-1	290028	Eşleşme yok
İnsan koronavirüsü OC43	OC43	31631	Eşleşme yok
İnsan Koronavirüsü	MERS-CoV	1335626	Eşleşme yok
İnsan Metapnömovirüs	uygulanamaz	162145	Eşleşme yok
İnfluenza A	H1N1	114727	Eşleşme yok
İnfluenza A	H3N2	119210	Eşleşme yok
İnfluenza B	uygulanamaz	11520	Eşleşme yok
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Eşleşme yok
Parainfluenza virüsü	Tip 1	12730	Eşleşme yok
Parainfluenza virüsü	Tip 2	2560525	Eşleşme yok
Parainfluenza virüsü	Tip 3	11216	Eşleşme yok
Parainfluenza virüsü	Tip 4	2560526	Eşleşme yok
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Eşleşme yok
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Olası amplifikasyon yok*
Respiratuvar sinsitiyal virüs	Tip A (RSV-A)	208893	Eşleşme yok
Respiratuvar sinsitiyal virüs	Tip B (RSV-B)	208895	Eşleşme yok
Rinovirüs	Tip A	147711	Eşleşme yok
Rinovirüs	Tip B	147712	Eşleşme yok
SARS-coronavirus	Tor2	694009	Olası amplifikasyon yok†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	uygulanamaz	1282	Eşleşme yok
<i>Streptococcus pyogenes</i>	uygulanamaz	1314	Olası amplifikasyon yok†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Olası amplifikasyon yok†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Eşleşme yok

* Primerler/problardan biriyle sekans eşleşmesi <%80 homoloji göstermiştir.

† Primerler/problardan biriyle sekans eşleşmesi ≥%80 homoloji göstermiştir.

In vitro analiz

Çapraz reaktivite, in siliko analizde SARS-CoV-2 Amp Primerleri ile \geq %80 homoloji gösteren patojenler ile in vitro olarak doğrulanmıştır. Örnekler, tedarikçisinin önerisi doğrultusunda seyreltilmemiş olarak test edilen SARS-CoV-1 hariç olmak üzere, 10^6 cp/ml konsantrasyonda potansiyel çapraz reaktif organizmalar nazofaringeal sürüntüye eklenerek hazırlanmıştır. Bu patojenlerden hiçbiri in vitro çapraz reaktivite göstermemiştir.

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit tahlilinin mikrobiyal etkileşimi, önerilen patojenlerden oluşan bir panel üzerinde in vitro olarak değerlendirilmiştir. Örnekler, maksimum 5 patojen (viral hedefler için 105 TCID50/mL, bakteriyel ve fungal hedefler için 10^6 cp/mL veya stok konsantrasyonuna dayalı olarak mümkün olan en yüksek konsantrasyonda) $2,87 \times \text{LoD}$ 'de inaktif SARS-CoV-2 partikülleri (Zeptomatrix) eklenmiş negatif nazofaringeal sürüntülere eklenerek hazırlanmıştır. NATtrol™ Panelleri ve SARS-CoV-1'e doğrudan $2,87 \times \text{LoD}$ 'de inaktif SARS-CoV-2 viral partikülleri (Zeptomatrix) eklenmiştir. Test edilen her bir mikroorganizma havuzunun sonuçları ve ilgili konsantrasyonlar aşağıda özetlenmiştir.

Tablo 15. Mikrobiyal etkileşim bakımından in vitro test edilen patojenlerin listesi.

Havuz Kimliği / Örnek Kimliği	Mikroorganizma	Kaynak	Son konsantrasyon	Birim	Sonuç
Havuz 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	İnsan koronavirüsü 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	İnsan koronavirüsü OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	
	Human coronavirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/ml	
	Adenovirüs T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Parainfluenza virüsü 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/ml	
Havuz 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	Adenovirüs T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Parainfluenza virüsü 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	İnfluenza B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Rinovirüs T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	

(Devamı bir sonraki sayfadadır)

Tablo 15 (Bir önceki sayfadan devam etmektedir)

Havuz Kimliği / Örnek Kimliği	Mikroorganizma	Kaynak	Son konsantrasyon	Birim	Sonuç
Havuz 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	Parainfluenza Virüsü T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	
Havuz 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	Adenovirüs T7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1,02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1,00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
Havuz 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	Respiratuvar sinsitiyal virüs RSV A	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	İnfluenza A H1N1 California	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirüs Tip 68 Ana Grup	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenovirüs T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Havuz 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	MERS-coronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Adenovirüs T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	İnsan Metapnömovirüsü (hMPV) Tip B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Respiratuvar Sinsitiyal Virüs Tip B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(Devamı bir sonraki sayfadadır)

Tablo 15 (Bir önceki sayfadan devam etmektedir)

Havuz Kimliği / Örnek Kimliği	Mikroorganizma	Kaynak	Son konsantrasyon	Birim	Sonuç
Havuz 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	Adenovirüs T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Parainfluenza virüsü 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	İnfluenza A H3N2 Switzerland/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Havuz 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	NATrol Panel RP1 (İnfluenza A H3N2 (Brisbane/10/07), İnfluenza A H1N1 (NY/02/2009), Rinovirüs (Tip 1A), Adenovirüs T3, Parainfluenza T1, Parainfluenza virüsü T4, Metapnömovirüs (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Koksakivirüs (Tip A1))	Zeptomatrix (MDZ001)	Bilinmiyor*	Uygulanamaz	
Havuz 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	NATrol Panel RP2 (İnfluenza A H1 (New Caledonia/20/99), İnfluenza B (Florida/02/06), RSV-A, Parainfluenza T2, Parainfluenza T3, Koronavirüs HKU rekombinant, Koronavirüsler (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639))	Zeptomatrix (MDZ001)	Bilinmiyor*	Uygulanamaz	
Havuz 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS (COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Etkileşim yok
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Bilinmiyor*	Uygulanamaz	

* Konsantrasyon tedariği tarafından belirtilmemiştir.

Olumsuz etkileyen maddeler

Olumsuz etkilediği kabul edilen maddelerin (Tablo 16'da listelenen maddeler için) *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit performansı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Testler, negatif nazofaringeal sürüntülerden oluşan 3 havuzda ve 4 x LoD inaktif SARS-CoV-2 viral partikülleri (Zeptometrix) eklenmiş pozitif nazofaringeal sürüntülerden oluşan 3 havuzda gerçekleştirilmiştir. Deneyler, 1 operatör tarafından 1 pilot kit ile RGQ MDx 5plex HRM platformunda (4 cihazda) gerçekleştirilmiştir.

Her havuz, bir çözücü içinde çözülmüş olumsuz etkileyen maddeyi (test örneği) veya tek başına çözücüyü (kontrol örneği) test etmek üzere 2'ye ayrılmıştır. Yeşil ve kırmızı floresans kanallarındaki doğruluk oranları, test ve teste karşılık gelen kontrol örnekleri arasında karşılaştırılmıştır. Etkileşim yokluğunda, test ve teste karşılık gelen kontrol örnekleri aynı doğruluk oranına sahiptir.

Tablo 16, test edilen maddelerden hiçbirinin, yeşil floresans kanalında *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit performansını olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.

Tablo 16. Olumsuz etkileyen maddelerin listesi.

Olumsuz etkileyen maddeler	İşlev	Test edilen konsantrasyon	Negatif nazofaringeal sürüntüdeki sonuçlar	Pozitif (4x LoD) nazofaringeal sürüntüdeki sonuçlar
Tobramisin	Sistemik antibiyotik	1 mg/ml	Etkileşim yok 0/15	Etkileşim yok 0/15
Mupirosin	Nazal antibiyotik merhem	6,6 mg/ml	Etkileşim yok 0/15	Etkileşim yok 0/15
Flutikazon	Nazal kortikosteroid	%5 (h/h)	Etkileşim yok 0/15	Etkileşim yok 0/15
Mentol (Boğaz pastilleri)	Oral anestezi ve analjezik	0,5 mg/ml	Etkileşim yok 0/15	Etkileşim yok 0/15

(Devamı bir sonraki sayfadadır)

Tablo 16. (Bir önceki sayfadan devam etmektedir)

Olumsuz etkileyen maddeler	İşlev	Test edilen konsantrasyon	Negatif nazofaringeal sürüntüdeki sonuçlar	Pozitif (4x LoD) nazofaringeal sürüntüdeki sonuçlar
Oksimetazolin	Nazal sprey	%10 (h/h)	Etkileşim yok (0/15)	Etkileşim yok (0/15)
Osetamivir	Antiviral ilaç	3,3 mg/ml	Etkileşim yok (0/15)	Etkileşim yok (0/15)
Müsin (Bovin submaksiller bezi tip I-S)		2,5 mg/ml	Etkileşim yok (0/15)	Etkileşim yok (0/15)
Tam Kan		%4 (h/h)	Etkileşim yok (1/15*)	Etkileşim yok (0/15)

* Bir artefakta karşılık gelen bir amplifikasyon saptanmıştır.

Kesinlik

Kesinlik çalışması, yeniden üretilebilirliği (aynı örnek farklı çalışmalar ve koşullarda tekrar edilmiştir: 5 gün, 3 kit lotu, 3 operatör ve 2 cihaz) ve tekrarlanabilirliği (aynı örnek aynı çalışma ve koşulda tekrar edilmiştir) değerlendirmiştir. Testler, RGQ MDx cihazında, negatif nazofaringeal örnekler ve 5 x LoD ile bozundurulmuş negatif nazofaringeal örnekler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Her dilüsyon seviyesi için 204 veri noktası alınmıştır. Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik verileri, yeşil, sarı ve kırmızı kanallarda SARS-CoV-2 hedefleri için standart sapmayı (Standard Deviation, SD) ve varyasyon katsayısını (Coefficient of Variation, %CV) belirlemek için kullanılmıştır. Tablo 17'de, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in yeşil kanalda 0,63 SD (%2,03 CV), sarı kanalda 0,54 SD (%2,22 CV) ve kırmızı kanalda 1,28 SD (%4,10 CV) genel kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 17. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in standart sapması ve varyasyon katsayısı

Örnekler ve saptama kanalı	Toplam	Günler arası	Gruplar arası	Operatörler arası	Cihazlar arası	Çalışmalar arası	Çalışma içi
Standart sapma (Standard Deviation, SD) (Varyasyon katsayısı (Coefficient of Variation, %CV))							
Negatif NPS Yellow kanal	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Negatif NPS Red kanal	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Bozundurulmuş NPS Green kanal	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
Bozundurulmuş NPS Yellow kanal	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
Bozundurulmuş NPS Red kanal	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Klinik Performans

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp tahlilinin klinik performansı, taşıma besiyeri içinde geriye dönük nazofaringeal sürüntü numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir ve numuneler aşağıdakilerden oluşmaktadır:

- 98 adet SARS-CoV-2 RNA negatif numune
- 52 adet SARS-CoV-2 RNA pozitif numune

Tüm numuneler COVID-19 enfeksiyonu belirti ve semptomları gösteren hastalardan alınmış ve kullanılacağı zamana kadar dondurulmuştur.

Klinik doğrulama ABI 7500 Fast Dx üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tablo 18, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in referans yöntemine göre performansını, pozitif uyumluluk oranı (Positive Percent Agreement, PPA) ve negatif uyumluluk oranı (Negative Percent Agreement, NPA) olarak ifade edilecek şekilde raporlamaktadır.

Tablo 18. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in bir referans yöntemle karşılaştırmalı olarak klinik performansı

Örnek Tipi	N	Pozitif %'si	%95 CI	Negatif %'si	%95 CI
Pozitif	52	98,1 (51/52)	89,9-99,7	5,1 (5/98)	
Negatif	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7-97,8

Uyumsuz sonuçlar, üçüncü bir yöntemle değerlendirilmiş ve bir olasılık tablosuyla yeniden analiz edilmiştir. Genel klinik performans sonuçları, pozitif uyumluluk oranı (Positive Percent Agreement, PPA) ve negatif uyumluluk oranı (Negative Percent Agreement, NPA) olarak ifade edilir ve Tablo 19 içerisinde göstermektedir.

Tablo 19. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in klinik performansı

Örnek Tipi	N	Pozitif %'si	%95 CI	Negatif %'si	%95 CI
Pozitif	52	98,1 (51/52)	89,9-99,7	5,1 (5/98)	
Negatif	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7-97,8

Aşağıda, uyumluluk gösteren örnek fraksiyonları ile beklenen örnek durumlarını içeren pozitif ve negatif uyumluluk oranı (sırasıyla PPA ve NPA) listelenmektedir:

Pozitif Uyumluluk Oranı

(Positive Percent Agreement, PPA%): $51/52 = \%98,1$ (%95 CI: %89,9-%99,7)

Negatif Uyumluluk Oranı

(Negative Percent Agreement, NPA%): $93/98 = \%94,9$ (%95 CI: %88,6-%97,8)

Asemptomatik bireyler dahil klinik performans

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp tahlilinin klinik performansı, taşıma besiyeri içinde geriye dönük nazofaringeal sürüntü numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir ve numuneler aşağıdakilerden oluşmaktadır:

- 100 adet SARS-CoV-2 RNA negatif numune
- 53 adet SARS-CoV-2 RNA pozitif numune

Tüm numuneler, COVID-19 enfeksiyonundan şüphelenilmesi için semptomlar veya başka nedenler bulunmayan kişilerden toplanmıştır.

Klinik doğrulama ABI 7500 Fast Dx üzerinde gerçekleştirilmiştir. Örnek geçerlilik kriterlerine göre geçersiz bir durum nedeniyle *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit test edildikten sonra on altı örnek analiz dışında bırakılmıştır (Tablo 13).

Tablo 20, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in referans yöntemle göre performansını, pozitif uyumluluk oranı (Positive Percent Agreement, PPA) ve negatif uyumluluk oranı (Negative Percent Agreement, NPA) olarak ifade edilecek şekilde raporlamaktadır.

Tablo 20. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in bir referans yöntemle karşılaştırmalı olarak klinik performansı

Örnek Tipi	N	Pozitif %'si	%95 CI	Negatif %'si	%95 CI
Pozitif	50	64,0 (32/50)	50,1-75,9	1,15 (1/87)	–
Negatif	87	36,0 (18/50)	–	98,85 (86/87)	93,8-99,8

On dokuz uyumsuz sonuç, üçüncü bir yöntemle değerlendirilmiş ve bir olasılık tablosuyla yeniden analiz edilmiştir. Genel klinik performans sonuçları, pozitif uyumluluk oranı (Positive Percent Agreement, PPA) ve negatif uyumluluk oranı (Negative Percent Agreement, NPA) olarak ifade edilir ve Tablo 21 içerisinde göstermektedir.

Tablo 21. artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in klinik performansı

Örnek Tipi	N	Pozitif %'si	%95 CI	Negatif %'si	%95 CI
Pozitif	32	100,0 (32/32)	89,3-100,0	0,95 (1/105)	–
Negatif	105	–	–	99,05 (104/105)	94,8-99,8

On sekiz yanlış negatif örnek gerçek negatifler olarak yeniden sınıflandırılırken bir yanlış pozitif, yanlış pozitif olarak kalmıştır.

Aşağıda, uyumluluk gösteren örnek fraksiyonları ile beklenen örnek durumlarını içeren pozitif ve negatif uyumluluk oranı (sırasıyla PPA ve NPA) listelenmektedir:

Pozitif Uyumluluk Oranı

(Positive Percent Agreement, PPA): $32/32 = \%100,0$ (%95 CI: %89,3-%100,0)

Negatif Uyumluluk Oranı

(Negative Percent Agreement, NPA): $104/105 = \%99,05$ (%95 CI: %94,8-%99,8)

Referanslar

1. CUI J *et al.* (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17**, 181-192
2. Gagneur *et al.* (2002) Infections nosocomiales à coronavirus humains chez le nouveau-né. *Arch Pédiatr* **9**, 61-69
3. HU *et al.* (2020) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **6**:1-14.
4. Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol. Infect* **10**(3), 190–212
5. European Commission. (2020) Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria. 16 April 2020. <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/40805/attachments/1/translations/en/renditions/native>

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu, ortaya çıkabilecek sorunların çözülmesine yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Yorum ve öneriler

Pozitif Kontrolde (PC) Zayıf veya Eksik Yeşil sinyal (FAM)

- | | |
|--|--|
| a) RT-PCR veri analizi için seçilen floresans kanalı protokole uymamaktadır. | Veri analizinde; analitik SARS-CoV-2 RT-PCR hedefleri için floresans kanalı FAM (yeşil), örnekleme kontrolü için floresans kanalı HEX/IC/JOE (sarı) ve dahili kontrol için Cy5/Atto (kırmızı) ögesini seçin. |
| b) Sıcaklık profilinin yanlış programlanması. | RT-PCR programını protokolle karşılaştırın. |
| c) Hatalı PCR reaksiyonu konfigürasyonu | Çalışma adımlarınızı pipetleme şemasıyla doğrulayın ve gerekirse PCR'ı tekrarlayın. |
| d) Bir veya daha fazla kit bileşeninin saklama koşulları talimatlara uygun değildir veya <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit'in süresi dolmuştur. | Saklama koşullarına uyun, reaktiflerin son kullanma tarihini doğrulayın ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |
| e) Veri yapılandırması sırasında qPCR platformunun hatalı yapılandırması. | Bu kılavuzda açıklanan şekilde qPCR platformunuzla ilgili önerilen yapılandırmaları uygulayın. |
| f) PCR inhibe olmuştur. | Kontaminant girişinden kaçınmak için moleküler biyoloji laboratuvarında iyi uygulamaları izleyin. Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun. Bu kılavuzda belirtilen protokolü izleyin. Reaktifin son kullanma tarihini kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. Tahlili başka bir örnek ile tekrarlayın. |

Şablonsuz Kontrolde veya Ekstraksiyonsuz Kontrolde yeşil sinyal (FAM)

RT-PCR plakası hazırlama işlemi sırasında SARS-CoV-2 sekansları ile kontaminasyon gerçekleşmiştir.

RT-PCR'yi yeni reaktiflerle tekrarlayın. Kontaminant girişinden kaçınmak için moleküler biyoloji laboratuvarında iyi uygulamaları izleyin. Bu el kitabında belirtilen protokolü izleyin. Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun.

Yorum ve öneriler

Dahili Kontrolden zayıf veya eksik kırmızı sinyal (Cy5/Atto)
















- a) RT-PCR reaksiyonunda bir interferan girişi olmuştur. PCR inhibe olmuştur.
- Kontaminant girişinden kaçınmak için moleküler biyoloji laboratuvarında iyi uygulamaları izleyin.
Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun.
Bu kılavuzda belirtilen protokolü izleyin.
Deneyi yeni alınmış bir örnek ile tekrarlayın.
- b) Dahili kontrol bozunmuştur.
- RNAse girişinden kaçınmak için moleküler biyoloji laboratuvarında iyi uygulamaları izleyin. Bu kılavuzda belirtilen önerileri izleyin.
Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun.
Saklama koşullarına uyun, reaktiflerin son kullanma tarihini kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.
- c) Veri yapılandırması sırasında qPCR platformunun hatalı yapılandırması.
- Bu kılavuzda açıklanan şekilde qPCR platformunuzla ilgili önerilen yapılandırmaları uygulayın.

Örnekleme kontrolünde zayıf veya eksik sarı sinyal (VIC/HEX)

- a) Klinik örnek bozunmuştur.
- Saklama, işleme ve taşıma için örnek alma cihazının tedarikçisi tarafından sağlanan önerilere uyun.
SARS-CoV-2 UM Prep Buffer ile örnek hazırlama adımları dahil olmak üzere, bu kılavuzda belirtilen protokole uyun.
Saklama koşullarına uyun, SARS-CoV-2 UM Prep Buffer gibi reaktiflerin son kullanma tarihini kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.
- b) Numune düzgün şekilde alınmamıştır. Sürüntü üzerinde yeterli insan hücresi toplanmamış veya taşıma besiyerinde aktarılmamıştır.
- Numune alma ve numune işleme için örnek alma cihazının tedarikçisi tarafından sağlanan önerilere uyun.
- c) Veri yapılandırması sırasında qPCR platformunun hatalı yapılandırması.
- Bu kılavuzda açıklanan şekilde qPCR platformunuzla ilgili yapılandırmaları uygulayın.

Semboller

Aşağıdaki semboller, kullanım talimatlarında veya ambalaj ve etikette görülebilir:

Sembol	Sembol tanımı
	768 veya 3072 reaksiyon için yeterli reaktif içerir
	Son kullanma tarihi
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Katalog numarası
	Lot numarası
	Bileşenler
	İçindekiler
	Numara
	Küresel Ticaret Parça Numarası
	R, Kullanma Talimatı revizyonu olup n ise revizyon numarasıdır
	Sıcaklık sınırlaması
	Üretici
	Kullanma talimatlarına bakın
	Güneş ışığından uzak tutun
	Uyarı/dikkat

İletişim Bilgileri

Teknik yardım ve daha fazla bilgi için lütfen **support.qiagen.com** adresinden QIAGEN Teknik Servisleri ile iletişime geçin.

Sipariş Bilgisi

Ürün	İçerik	Kat. no.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	768 reaksiyon için: Hazırlama Tamponu, ROX boyası, Master Karışım, Primerler ve Problar, Dahili Kontrol, Su (NTC) ve Pozitif Kontrol	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	3072 reaksiyon için: Hazırlama Tamponu, ROX boyası, Master Karışım, Primerler ve Problar, Dahili Kontrol, Su (NTC) ve Pozitif Kontrol	4511469
Cihaz ve aksesuarlar		
PCR tüpleri, Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx için 0,1 ml	72-well rotor, Strip tüpleri ve kapaklar ile kullanım için	981103
Rotor-Gene Q yazılımı	Rotor-Gene Q yazılımı v2.3.1 (veya üzeri)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	5 kanallı real-time PCR döngüleyici, yüksek çözünürlüklü melt analizörü, yazılım, dizüstü bilgisayar ve aksesuarlar; parçalar ve işçilik için 1 yıl garanti, kurulum	9002032
Loading Block	72 x 0,1 ml tüp	9018901

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne özgü ret beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servislerinden veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Belge Revizyon Geçmişi

Revizyon	Açıklama
R1, Nisan 2021	İlk sürüm.
R2, Temmuz 2021	<p>İstem Kapsamı: Test, asemptomatik bireylerde kabul görmüştür. Kullanım Amacı, COVID-19 enfeksiyonundan şüphelenilmesi için semptomlar veya başka nedenler bulunmayan kişiler dahil edilecek şekilde güncellenmiştir. Asemptomatik bireyler dahil klinik performans hakkındaki bölüm Performans verilerine eklenmiştir.</p> <p>Sınırlamalar Bölümündeki "Solunum enfeksiyonu belirti ve semptomları olmayan hastalar için bu testin performansı belirlenmemiştir" ifadesi çıkarılmıştır.</p> <p>Küçük editoryal değişiklikler ve biçim değişiklikleri.</p>

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle birlikte ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca panelin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu panel ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenler dışında bu panelin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde test edilmiş veya optimize edilmiştir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu panel ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu panel ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenden dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Panelin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya panel ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. www.qiagen.com.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zepmetrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® (Microsoft Corporation); ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific veya Bağlı kuruluşları). Bu belgede geçen tescilli adlar, ticari markalar vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarla korunmaktadır.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

Sipariş www.qiagen.com/shop | Teknik Destek support.qiagen.com | Web sitesi www.qiagen.com