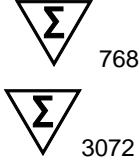


Eylül 2021

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



Sürüm 1

IVD

Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM, ABI[®] 7500 Fast Dx, QuantStudio[®]
5 Dx, cobas[®] z 480 veya CFX96[™] Dx cihazlarında İn Vitro Tanı
Amaçlı Kullanım için



REF

4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R3

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 Malzemeler | 12 |
| Sarf Malzemeleri ve Ekipman..... | 12 |
| Uyarılar ve Önlemler..... | 14 |
| Güvenlik bilgileri..... | 14 |
| Önlemler..... | 15 |
| Reaktif Saklama ve Kullanma..... | 16 |
| Numune Taşıma, Saklama ve Kullanma | 16 |
| Protokol: RGQ MDx 5plex HRM'de örnek hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması | 18 |
| Protokol: ABI 7500 Fast Dx'de Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması..... | 24 |
| Protokol: CFX96 Dx'te Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması | 29 |
| Protokol: cobas z 480'de Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması | 34 |
| Protokol: QuantStudio 5 Dx'te Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması | 39 |
| Sonuçlar | 44 |
| RGQ MDx 5plex HRM'de analiz..... | 44 |

| | |
|--|----|
| ABI 7500 Fast Dx'te analiz | 46 |
| CFX96 Dx'te analiz..... | 46 |
| cobas z 480'de analiz | 48 |
| QuantStudio 5 Dx'te analiz | 49 |
| Sonuçların Yorumlanması | 51 |
| Sınırlamalar | 53 |
| Performans..... | 54 |
| Analitik duyarlılık (Tespit sınırı) | 54 |
| Analitik özgüllük çalışmaları (Dahil olma ve münhasırlık/çapraz reaktivite)..... | 55 |
| Kesinlik..... | 65 |
| Klinik Performans | 67 |
| Referanslar | 72 |
| Sorun Giderme Kılavuzu | 73 |
| Semboller | 75 |
| İletişim Bilgileri..... | 77 |
| Sipariş Bilgisi | 78 |
| Belge Revizyon Geçmişi..... | 79 |

Kullanım Amacı

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, enfeksiyon belirti ve semptomları gösteren 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 tespiti için tasarlanan bir real-time RT-PCR testidir. Seyreltilmemiş tükürük numuneleri için test, enfeksiyon belirti ve semptomları gösteren veya COVID-19 olduğundan şüphelenilen kişilere yöneliktir.

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 RT-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 MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 veya CFX96 Dx ile birlikte kullanıma yöneliktir.

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) ve seyreltilmemiş tükürük numunelerinden saptanabilir (3).

Hasta geçmişi ve SARS-CoV-2 epidemiyolojisi ile bir araya getirilen real-time 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 real-time RT-PCR temelli tahlillerin immünoassay'ler ile birlikte kullanımını önermiştir (4, 5).

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, N geninin aynı floresans kanalıyla saptanan 2 hedefini (N1 ve N2) kapsayacak şekilde tasarlanmıştır. İki hedef ayırt edilemez ve hedeflerden birinin veya her ikisinin amplifikasyonu bir floresans sinyaline neden olur. Pozitif sonuçlar SARS-CoV-2'nin varlığına işaret eder ancak diğer patojenlerle koenfeksiyonu olasılık dışında bırakmaz. Diğer yandan, negatif real-time 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, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 veya QuantStudio 5 Dx sisteminde real-time RT-PCR kullanılarak SARS-CoV-2 RNA'sının saptandığı kullanıma hazır bir sistem oluşturur (Şekil 1).

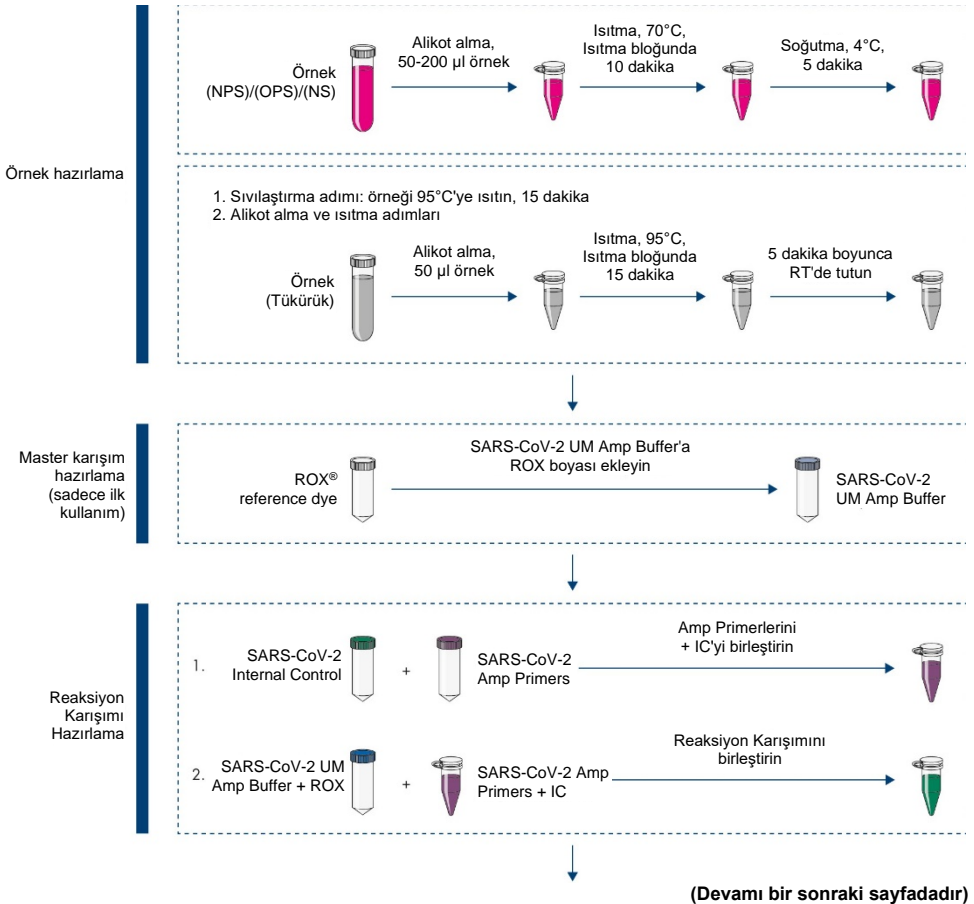
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 RNA genomunun bir 72 baz çiftinin (base pair, bp) ve bir 67 bp bölgesinin spesifik amplifikasyonu için ve bunların, RGQ MDx cihazlarının "Green" floresans kanalında ve ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480, veya QuantStudio 5 Dx sisteminin "FAM" floresans kanalında 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, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 veya QuantStudio 5 Dx sisteminin VIC/HEX kanalında saptandığında bu amplifikasyonlar, yeterli miktarda biyolojik örnek alınmasını 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.

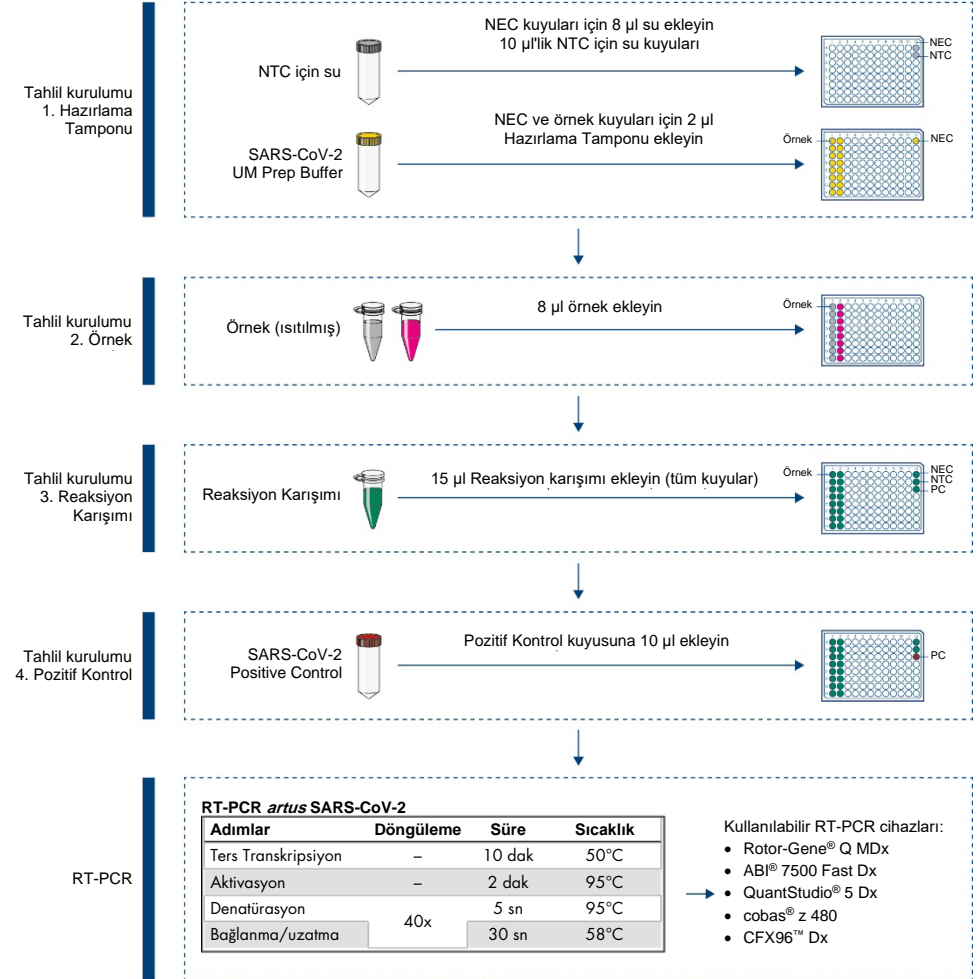
artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit, olası real-time RT-PCR inhibisyonunu ortaya çıkarmak için üçüncü bir heterolog amplifikasyon sistemi de içerir. Bu, RGQ MDx cihazlarının "Red" floresans kanalında ya da ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 veya QuantStudio 5 Dx sisteminin Cy5/ATTO647N kanalında dahili bir RNA kontrolü (Internal Control, IC) olarak saptanır. IC, SARS-CoV-2 Amp Primers Mix'e dahil olduğundan, örnekte veya PCR reaksiyonunda amplifikasyonu geciktiren veya engelleyen bir real-time 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 kontrolleri (sırasıyla SARS-CoV-2 Positive Control ve NTC olarak kullanılan nükleaz içermeyen su) temin edilir. Hazırlama tamponunda real-time 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 kontrolleri ile izlenir.



(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 | NTC için su | 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, real-time RT-PCR etkililiğini 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 adımımda yer alan reaktifin etkililiğini doğrular.

Ekstraksiyonsuz kontrol (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 örneklere 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, aşağıdaki real-time RT-PCR cihazlarının ve bunların uygun yazılımının kullanılmasını gerektiren beş 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
- CFX Manager Dx Yazılım sürümü 3.1.3090.1022 veya üzeri ile CFX96 Dx
- LightCycler® 480 SW UDF sürüm 2.0.0 veya üzeri ile cobas z 480
- QuantStudio 5 Dx IVD Yazılım sürümü 1.0.1 veya üzeri ve QuantStudio 5 Dx TD yazılım sürümü 1.0.1 veya üzeri ile QuantStudio 5 Dx

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler

Sarf Malzemeleri ve Ekipman

Ortak sarf malzemeleri ve ekipman

- 2 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu masaüstü santrifüjü
- Pipetler (ayarlanabilir)
- Vorteks karıştırıcı
- Blok ısıtıcı
- Tek kullanımlık pudrasız eldivenler
- Steril ve nükleaz içermeyen, filtreli pipet uçları
- 1,5 ml veya 2 ml'lik PCR içermeyen tüpler
- 96 kuyulu plakalı santrifüj cihazı

Her platform için sarf malzemeleri ve ekipman

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Cihazı

- Rotor-Gene Q MDx ile kullanım için 0,1 ml'lik PCR tüpleri (Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, kat. no. 981103).
- 72-Well Rotor (kat. no. 9018903) ve Locking Ring 72-Well Rotor (kat. no. 9018904)

ABI 7500 Fast Dx Cihazı

- 96-Well MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, kat. no. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, kat. no. 4360954)

CFX96 Dx Cihazı

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, düşük profilili, ince duvarlı, etekli beyaz/şeffaf (Bio-Rad Laboratories Inc., kat. no. HSP9601)
- Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, Adhesive, Optical (Bio-Rad Laboratories Inc., kat. no. MSB1001).

cobas z 480 Cihazı

- LightCycler 480 Multiwell Plate, beyaz (Roche Group, kat. no. 04729692001).
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, kat. no. 04729757001).

QuantStudio 5 Dx Cihazı

- MicroAmp EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, kat. no. A36924)
- MicroAmp Optical Adhesive film (Thermo Fisher Scientific, kat. no. 4360954)

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 ve seyreltilmemiş tükürük numuneleri 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.

Nazofaringeal, nazal ve orofaringeal sürüntü alma, taşıma ve saklama

Sürüntü alma, saklama ve taşıma için lütfen tedarikçinin önerilerine başvurun. Sürüntüler, numune bütünlüğünü korumak için taşıma besiyerine tamamen daldırılmış olmalıdır. Nazofaringeal sürüntü örnekleri stabil kalır ve aşağıdaki koşullarda saklanabilir:

- 72 saate kadar 4°C (2 ila 8°C)
- 2 hafta boyunca -70°C

Nazofaringeal sürüntü örnekleri, 3 dondurma-çözdürme döngüsü sonunda stabil kalır.

Seyreltilmemiş tükürük örneği alma, taşıma ve saklama

Seyreltilmemiş tükürük örnekleri, herhangi bir koruyucu, tampon veya başka katkı maddeleri olmadan steril kaplarda toplanmalıdır.

Seyreltilmemiş tükürük almaya yönelik talimatlar:

- Seyreltilmemiş tükürük alımından önce öksürmekten kaçının.
- Seyreltilmemiş tükürük alımından 30 dakika önce yemek, içmek, sigara veya elektronik sigara içmek, sakız çiğnemek veya diş fırçalamaktan kaçının.
- Seyreltilmemiş tükürük alımından 24 saat önce dişler üzerinde işlem veya diş muayenesi gerçekleştirilmemelidir.

Seyreltilmemiş tükürük örnekleri stabil kalır ve aşağıdaki koşullarda saklanabilir:

- 72 saate kadar oda sıcaklığında (18-26°C)
- 72 saate kadar 4°C (2 ila 8°C)
- RT'de, ardından 4°C'de, ardından 12 güne kadar -20°C'de (-30 ila -15°C) olmak üzere birleşik saklama
- 1 ay boyunca -20°C (-30 ila -15°C)

Seyreltilmemiş tükürük örnekleri, 3 dondurma-çözdürme döngüsü sonunda stabil kalır.

Örnek saklama koşulları bu kılavuzda belirtilenlerden farklılık gösteriyorsa lütfen kendi saklama koşullarınızı doğrulayın.

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

Bu protokol, Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.3.1.49 (veya üzeri) ile ilişkili RGQ MDx 5plex HRM real-time RT-PCR cihazında, taşıma besiyerinde saklanan insan nazal, nazofaringeal veya orofaringeal sürüntülerinde ve seyreltilmemiş tükürük örneklerinde SARS-CoV-2 hedeflerini saptamaya yönelik örnek ve real-time 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 RNAzlar ile kontaminasyondan kaçınmaya ve nükleaz içermeyen plastik malzemeler kullanmaya özen gösterin.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Solunum örnekleri, hazırlama adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) saklanabilir ancak buz üstünde veya 4°C'de soğutma rafında saklanması önerilir.
- Tükürük örnekleri buz üstünde veya 4°C'de buz üstünde tutulabilir ancak bunların hazırlık adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) tutulması 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 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 RNAzları inhibe eder ancak virüs inaktive edici bir çözelti değildir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.
- Real-time RT-PCR 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

Örnek hazırlama: Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler) için Adım 1'i izleyin. Tükürük numuneleri için Adım 2'ye geçin.

1. Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler):
 - 1a. Örneği içeren sürüntüyü kuvvetle vorteksleyin.
 - 1b. 50-200 µl örnek alikotunu 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüplere alın
 - 1c. Bir ısıtma bloğunda 70°C'de 10 dakika ısıtma adımı gerçekleştirin. Örnekleri buz üstünde en az 5 dakika boyunca soğutun, ardından örnekleri 4°C'de buz üstünde saklayın.
2. Tükürük örnekleri:
 - 2a. Sıvılaştırma (pipetlemeyi kolaylaştırmak için): tükürük örneğini 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtın (belirtilmemiş hacim, kap veya ısıtma cihazı).
 - 2b. Örneği 8-10 kez nazikçe yukarı ve aşağı pipetleyerek homojen hale getirin.
 - 2c. 50 µl örnek alikotunu 1,5 mL'lik PCR içermeyen bir tüpe alın.
 - 2d. Bir ısıtma bloğunda 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtma adımı gerçekleştirin, ardından örneği, PCR kuyusu veya tüpüne yükleyene kadar en az 5 dakika boyunca oda sıcaklığında tutun.

3. İlk kullanımda, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ROX reference dye ile tamamlayın.
 - 3a. 1 tüp SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'a 32,8 µl ROX boyası ekleyin.
 - 3b. SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ve ROX boyası içeren kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin.
 - 3c. Tüpün dibinde ROX boyası içeren SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı döndürerek aşağı indirin.
4. Tam RGQ MDx plakası (72 kuyulu) için SARS-CoV-2 Amp Primers ile SARS-CoV-2 Internal Control için bir alikot karışımı hazırlayın.
 - 4a. 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 içermeyen tüpe aktarın.
 - 4b. Kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin veya tüpü 3-5 sn puls vorteksleyin.
 - 4c. 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 konsantrasyon | 1 rxn | 72 rxn (+%20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45x | 1x | 7,25 | 626,4 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 129,6 |
| Toplam SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | 8,75 | 756 |

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

5. Tablo 2'ye göre bir reaksiyon karışımı hazırlayın ve tüpü 3 kez ters çevirerek iyice karıştırın.

Tablo 2. Reaksiyon karışımı kurulumu

| RT-PCR reaksiyon karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|--|---------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 72 rxn (+%20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp Buffer +ROX karışımı | 4x | 1x | 6,25 | 540 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | 2,9x | 1x | 8,75 | 756 |
| Toplam reaksiyon hacmi | — | | 15,00 | 1296 |

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

6. 8 µl nükleaz içermeyen suyu NEC'ye atanan PCR tüpüne dağıtın.
7. 10 µl nükleaz içermeyen suyu NTC'ye atanan PCR tüpüne yükleyin.
8. 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer'ı NEC ve hazırlanan örneklerle atanan her bir PCR tüpüne dağıtın.
9. 8 µl hazırlanmış örneği SARS-CoV-2 UM Prep Buffer içeren bir PCR tüpüne ekleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
10. Adım 5'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.
11. 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control uygun PCR tüpüne yükleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
12. RGQ MDx 5plex HRM'nin RT-PCR programını Tablo 3'teki spesifikasyonlara göre ayarlayın.

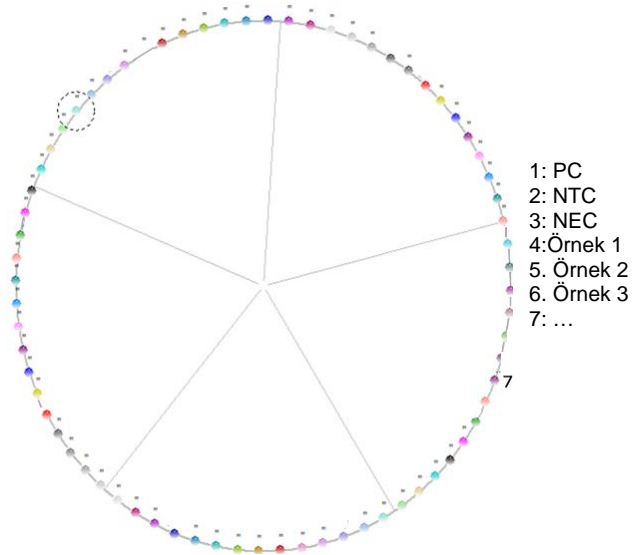
Not: Veri edinme, bağlanma/uzatma adımı sırasında gerçekleştirilmelidir.

13. 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 | 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, Yellow ve Red |



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

14. "New Run Wizard" (Yeni Çalışma Sihirbazı) içinde Gain optimization (Kazanç optimizasyonu) öğesine tıklayın ve Auto-gain Optimization Setup (Otomatik Kazanç Optimizasyon Kurulumu) öğesini açın.

15. 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.

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

17. Çalışmayı başlatın.

18. 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 real-time RT-PCR cihazında taşıma besiyerinde saklanan insan nazal, nazofaringeal veya orofaringeal sürüntülerinde ve seyreltilmemiş tükürük örneklerinde 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 RNAzlar 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

- Solunum örnekleri, hazırlama adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) saklanabilir ancak buz üstünde veya 4°C'de soğutma rafında saklanması önerilir.
- Tükürük örnekleri buz üstünde veya 4°C'de buz üstünde tutulabilir ancak bunların hazırlık adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) tutulması 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 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 RNAzları inhibe eder ancak virüs inaktive edici bir çözelti değildir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.
- Real-time RT-PCR 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

Örnek hazırlama: Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler) için Adım 1'i izleyin. Tükürük numuneleri için Adım 2'ye geçin.

1. Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler):
 - 1a. Örneği içeren sürüntüyü kuvvetle vorteksleyin.
 - 1b. 50-200 µl örnek alikotunu 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüplere alın.
 - 1c. Bir ısıtma bloğunda 70°C'de 10 dakika ısıtma adımını gerçekleştirin.
 - 1d. Örnekleri buz üstünde en az 5 dakika boyunca soğutun, ardından örnekleri 4°C'de buz üstünde saklayın.

2. Tükürük örnekleri:

- 2a. Sıvılaştırma (pipetlemeyi kolaylaştırmak için): tükürük örneğini 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtın (belirtilmemiş hacim, kap veya ısıtma cihazı).
 - 2b. Örneği 8-10 kez nazikçe yukarı ve aşağı pipetleyerek homojen hale getirin
 - 2c. 50 µl örnek alikotunu 1,5 ml'lik PCR içermeyen bir tüpe alın.
 - 2d. Bir ısıtma bloğunda 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtma adımını gerçekleştirin, ardından örneği, PCR kuyusu veya tüpüne yükleyene kadar en az 5 dakika boyunca oda sıcaklığında tutun.
3. İlk kullanımda, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ROX Reference Dye ile tamamlayın.
 - 3a. Bir tüp SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'a 32,8 µl ROX boyası ekleyin.
 - 3b. SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ve ROX boyası içeren kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin.
 - 3c. Tüpün dibinde ROX boyası içeren SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı döndürerek aşağı indirin.
 4. 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.
 - 4a. SARS-CoV-2 Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control'un gerekli hacimlerini Tablo 5'e göre yeni bir 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüpe aktarın.
 - 4b. Kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin veya tüpü 3-5 sn puls vorteksleyin.
 - 4c. 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 konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+ %20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45x | 1x | 7,25 | 835,2 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 172,8 |
| Toplam SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | 8,75 | 1008 |

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

5. Tablo 6'ya göre bir reaksiyon karışımı hazırlayın ve tüpü 3 kez ters çevirerek iyice karıştırın.

Tablo 6. Reaksiyon karışımı kurulumu

| RT-PCR reaksiyon karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|---|---------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+%20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX karışımı | 4x | 1x | 6,25 | 720 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | 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.

- 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 5'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.
- Çapraz kontaminasyonu önlemek için PCR plakasını iyice kapatın. Ayrı kuyularda sıkı bir mühür elde etmek için tüm plakaya homojen şekilde basınç uyguladığınızdan emin olun.
- Sıvıyı kuyunun alt kısmında toplamak için PCR plakasını kısa süre santrifüjleyin.
- Real-time RT-PCR programını Tablo 7'ye göre ABI 7500 Fast Dx "Standard 7500" (Standart 7500) Çalışma Moduna ayarlayın.

Not: **file** (dosya) ve **new** (yeni) öğelerine tıkladıktan sonra, tahlilin **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standart Eğri (Mutlak Kantifikasyon)) olduğunu ve Çalışma Modunun **Standard 7500** (Standart 7500) olarak ayarlandığını doğrulayın. Quencher (Baskılayıcı) **None** (Hiçbiri) olarak ayarlanmış halde FAM, VIC ve Cy5'i haberciler olarak seçin. Ayrıca veriler, **ROX passive reference** (pasif referans) olarak ayarlıyken elde edilmelidir.

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

Not: Lütfen daha ayrıntılı bilgi için *ABI 7500 Fast Dx Kullanım Talimatları* belgesine bakın.

15. Plakayı gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirin (PCR plaka düzeninin bir örneği Şekil 3'te sunulmuştur) ve Tablo 7'de açıklandığı şekilde döngüleme programını başlatın.
16. Kullanılan kuyuları seçin ve FAM, VIC ve Cy5 habercilerini uygulayın. Veriler, ROX pasif boya **ON** (AÇIK) ile edinilmelidir.
17. ABI 7500 Fast Dx Standart Eğrisinin Mutlak Kantifikasyon olarak yapılandırıldığını doğrulayın.
18. Çalışmayı başlatın.
19. Çalışmanın sonunda sonuçları analiz edin (bkz. Sonuçlar bölümü).

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

| Adımlar | Süre | Sıcaklık (°C) | Döngü sayısı | 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 | | FAM, VIC ve Cy5 |

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

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

Protokol: CFX96 Dx'te Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması

Bu protokol, şu cihazda taşıma besiyerinde saklanan insan nazal, nazofaringeal, orofaringeal sürüntülerinde ve seyreltilmemiş tükürük örneklerinde SARS-CoV-2 hedeflerinin hazırlanması ve saptanmasına yöneliktir: CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., kat. no.1845097-IVD). (optik reaksiyon modülü) ve 1841000-IVD (Thermal Cycler modülü); CFX Manager Dx Yazılım sürümü 3.1.309001022 veya üzeri ile.

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 RNAzlar ile kontaminasyondan kaçınmaya ve nükleaz içermeyen plastik malzemeler kullanmaya özen gösterin.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Solunum örnekleri, hazırlama adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) saklanabilir ancak buz üstünde veya 4°C'de soğutma rafında saklanması önerilir.
- Tükürük örnekleri buz üstünde veya 4°C'de buz üstünde tutulabilir ancak bunların hazırlık adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) tutulması 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 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 RNAzları inhibe eder ancak virüs inaktive edici bir çözelti değildir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.
- Real-time RT-PCR platformunun döngüleme koşullarının bu protokolde belirtilen şekilde olduğunu doğrulayın.
- Birden fazla dondurma-çözdürme döngüsünden kaçınmak için reaktiflerden alikot alınabilir.
- Reaksiyon karışımını taze olarak hazırlayın (PCR plakası başlangıcına <2 saat).
- Kontaminasyonu en aza indirmek için örnek ve real-time RT-PCR hazırlama ayrı bölgelerde yapılmalıdır.

Prosedür:

Örnek hazırlama: Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler) için Adım 1'i izleyin. Tükürük numuneleri için Adım 2'ye geçin.

1. Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler):
 - 1a. Örneği içeren sürüntüyü kuvvetle vorteksleyin
 - 1b. 50-200 µl örnek alikotunu 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüplere alın
 - 1c. Bir ısıtma bloğunda 70°C'de 10 dakika ısıtma adımını gerçekleştirin.
 - 1d. Örnekleri buz üstünde en az 5 dakika boyunca soğutun, ardından örnekleri 4°C'de buz üstünde saklayın.
2. Tükürük örnekleri:
 - 2a. Sıvılaştırma (pipetlemeyi kolaylaştırmak için): tükürük örneğini 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtın (belirtilmemiş hacim, kap veya ısıtma cihazı).
 - 2b. Örneği 8-10 kez nazıkçe yukarı ve aşağı pipetleyerek homojen hale getirin.
 - 2c. 50 µl örnek alikotunu 1,5 ml'lik PCR içermeyen bir tüpe alın.

- 2d. Bir ısıtma bloğunda 95°C'de 15 dakika ısıtma adımını gerçekleştirin. Ardından, PCR kuyusuna veya tüpüne yükleyene kadar örneği en az 5 dakika boyunca oda sıcaklığında tutun.
3. İlk kullanımda, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ROX reference dye ile tamamlayın.
 - 3a. 1 tüp SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'a 32,8 µl ROX boyası ekleyin.
 - 3b. SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ve ROX boyası içeren kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin.
 - 3c. Tüpün dibinde ROX boyası içeren SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı döndürerek aşağı indirin.
4. Tam CFX96 Dx plakası (96 kuyulu) için SARS-CoV-2 Amp Primers ile SARS-CoV-2 Internal Control için bir alikot karışımı hazırlayın.
 - 4a. SARS-CoV-2 Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control'un gerekli hacimlerini Tablo 8'e göre yeni bir 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüpe aktarın.
 - 4b. Kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin veya tüpü 3-5 sn puls vorteksleyin.
 - 4c. Çözeltiyi tüpün dibine getirmek için IC'yi içeren SARS-CoV-2 Amp Primers'ı aşağı doğru döndürün.

Tablo 8. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı kurulumu

| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|---|---------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+ %20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45x | 1x | 7,25 | 835,2 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 172,8 |
| Toplam SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | 8,75 | 1008 |

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

5. Tablo 9'a göre bir reaksiyon karışımı hazırlayın ve tüpü 3 kez ters çevirerek iyice karıştırın.

Tablo 9. Reaksiyon karışımı kurulumu

| RT-PCR reaksiyon karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|---|---------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+%20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX karışımı | 4x | 1x | 6,25 | 720 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | 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 hacimlerini test edilecek örnek sayısına göre ayarlayın. Ölü hacmi telafi etmek için ekstra hacmi değerlendirin.

- 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 5'te hazırlanan reaksiyon karışımından 15 µl'yi örneklerle ve kontrollere ayrılan kuyulara ekleyin (Şekil 4 örnek olarak sunulmuştur). Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
- 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control uygun kuyuya yükleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
- Çapraz kontaminasyonu önlemek için PCR plakasını iyice kapatın. Ayrı kuyularda sıkı bir mühür elde etmek için tüm plakaya homojen şekilde basınç uyguladığınızdan emin olun.
- Sıvıyı kuyunun alt kısmında toplamak için PCR plakasını kısa süre santrifüjleyin.
- CFX Manager Dx Software** (CFX Manager Dx Yazılımı) > **Startup Wizard** (Başlatma Sihirbazı) kısmında, **run type** (çalışma türü) alanında **user defined** (kullanıcı tanımlı) öğesini seçin.

15. **Protocol** (Protokol) sekmesi: 25 µl reaksiyon hacmi için real-time RT-PCR programını Tablo 10'a göre seçin.

Not: Protocol Editor (Protokol Editörü) penceresinde, RT-PCR programının 4 adımının her birinde artış hızını 1,6°C/sn olarak ayarlamak için **Step Options** (Adım Seçenekleri) düğmesine tıklayın.

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

Not: Lütfen daha ayrıntılı bilgi için *CFX96 Dx Kullanım Talimatları* belgesine bakın.

16. **Plate** (Plaka) sekmesi: Kullanılan kuyuları seçin ve FAM, HEX ve Cy5 habercilerini uygulayın.

17. Plakayı gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirin (PCR plaka düzeninin bir örneği Şekil 4'te sunulmuştur).

18. **Start Run** (Çalışmayı Başlat) sekmesi: Start the run (Çalışmayı başlat) öğesine tıklayın.

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

Tablo 10. CFX96 Dx için SARS-CoV-2 Prep&Amp UM programı

| Adımlar | Süre | Sıcaklık (°C) | Artış Hızı (°C/sn) | Tekrar sayısı | Edinim |
|----------------------------|--------|---------------|--------------------|---------------|-----------------|
| 1. Ters Transkripsiyon | 10 dak | 50 | 1,6 | 1 | Hayır |
| 2. PCR ilk ısı aktivasyonu | 2 dak | 95 | 1,6 | 1 | Hayır |
| 2 adımlı döngüleme | | | | 39* | |
| Denatürasyon | 5 sn | 95 | 1,6 | 1 | Hayır |
| Birleştirme/Uzatma | 30 sn | 58 | 1,6 | 1 | FAM, HEX ve Cy5 |

*CFX tekrarlar çalışır. Programın 40 döngü çalışması için, iki adımlı döngülemde 39 tekrar ayarlanmalıdır (yazılımda Adım 5 "GOTO" olarak).

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

Şekil 4. CFX96 Dx'te plaka düzeni örneği

Protokol: cobas z 480'de Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması

Bu protokol, LightCycler 480 SW UDF sürüm 2.0.0 (veya üzeri) bulunan cobas z 480'de, taşıma besiyerinde saklanan insan nazal, nazofaringeal, orofaringeal sürüntülerinde ve seyreltilmemiş tükürük örneğinde SARS-CoV-2 hedeflerini saptamaya yönelik örnek ve real-time 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 RNAzlar ile kontaminasyondan kaçınmaya ve nükleaz içermeyen plastik malzemeler kullanmaya özen gösterin.

Başlamadan önce yapılacaklar.

- Solunum örnekleri, hazırlama adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında saklanabilir; ancak buz üstünde veya 4°C'de soğutma rafında saklanması önerilir.
- Tükürük örnekleri buz üstünde veya 4°C'de buz üstünde tutulabilir ancak bunların hazırlık adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) tutulması 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 RNAzları inhibe eder ancak virüs inaktive edici bir çözelti değildir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.
- Real-time RT-PCR platformunun döngüleme koşullarının bu protokolde belirtilen şekilde olduğunu doğrulayın.
- Birden fazla dondurma-çözdürme döngüsünden kaçınmak için reaktiflerden alikot alınabilir.
- Reaksiyon karışımını taze olarak hazırlayın (real-time RT-PCR plaka başlangıcına <2 saat).
- Kontaminasyonu en aza indirmek için örnek ve real-time RT-PCR hazırlama ayrı bölgelerde yapılmalıdır.

Prosedür:

Örnek hazırlama: Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler) için Adım 1'i izleyin. Tükürük numuneleri için Adım 2'ye geçin.

1. Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler):
 - 1a. Örneği içeren sürüntüyü kuvvetle vorteksleyin.
 - 1b. 50-200 µl örnek alikotunu 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüplere alın
 - 1c. Bir ısıtma bloğunda 70°C'de 10 dakika ısıtma adımını gerçekleştirin.
 - 1d. Örnekleri buz üstünde en az 5 dakika boyunca soğutun, ardından örnekleri 4°C'de buz üstünde saklayın.
2. Tükürük örnekleri:
 - 2a. Sıvılaştırma (pipetlemeyi kolaylaştırmak için): tükürük örneğini 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtın (belirtilmemiş hacim, kap veya ısıtma cihazı).
 - 2b. Örneği 8-10 kez nazikçe yukarı ve aşağı pipetleyerek homojen hale getirin.
 - 2c. 50 µl örnek alikotunu 1,5 mL'lik PCR içermeyen bir tüpe alın.

- 2d. Bir ısıtma bloğunda 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtma adımını gerçekleştirin, ardından örneği, PCR kuyusu veya tüpüne yükleyene kadar en az 5 dakika boyunca RT'de tutun.
3. İlk kullanımda, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ROX reference dye ile tamamlayın.
 - 3a. 1 tüp SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'a 32,8 µl ROX boyası ekleyin.
 - 3b. SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ve ROX boyası içeren kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin.
 - 3c. Tüpün dibinde ROX boyası içeren SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı döndürerek aşağı indirin.
4. Tam cobas z 480 plakası (96 kuyulu) için SARS-CoV-2 Amp Primers ile SARS-CoV-2 Internal Control için bir alikot karışımı hazırlayın.
 - 4a. SARS-CoV-2 Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control'un gerekli hacimlerini Tablo 11'e göre yeni bir 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüpe aktarın.
 - 4b. Kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin veya tüpü 3-5 sn puls vorteksleyin.
 - 4c. Çözeltiyi tüpün dibine getirmek için IC'yi içeren SARS-CoV-2 Amp Primers'ı aşağı doğru döndürün.

Tablo 11. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı kurulumu

| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|---|---------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+ %20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45x | 1x | 7,25 | 835,2 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 172,8 |
| Toplam SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | 8,75 | 1008 |

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

5. Tablo 12'ye göre bir reaksiyon karışımı hazırlayın ve tüpü 3 kez ters çevirerek iyice karıştırın.

Tablo 12. Reaksiyon karışımı kurulumu

| RT-PCR reaksiyon karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|---|---------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+%20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX karışımı | 4x | 1x | 6,25 | 720 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | 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 hacimlerini test edilecek örnek sayısına göre ayarlayın. Ölü hacmi telafi etmek için ekstra hacmi değerlendirin.

- 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 5'te hazırlanan reaksiyon karışımından 15 µl'yi örneklerle ve kontrollere ayrılan kuyulara ekleyin (Şekil 5 örnek olarak sunulmuştur). Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
- 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control uygun kuyuya yükleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
- Çapraz kontaminasyonu önlemek için PCR plakasını iyice kapatın. Ayrı kuyularda sıkı bir mühür elde etmek için tüm plakaya homojen şekilde basınç uyguladığınızdan emin olun.
- Sıvıyı kuyunun alt kısmında toplamak için PCR plakasını kısa süre santrifüjleyin.

14. **İlk kullanım:** Light Cycler 480 SW UDF 2.0.0 yazılımında, **open tools** (araçları aç) öğesine tıklayın ve aşağıdaki eksitasyon-emisyon kombinasyonlarını ayarlamak için **detection formats** (saptama formatları) öğesini seçin: 465-510 (FAM), 540-580 (HEX) ve 610-670 (ATTO647N).
15. 25 µl reaksiyon hacmi için real-time RT-PCR programını Tablo 13'a göre seçin.
- Not:** Sayfanın üst kısmında, Adım 14'te oluşturulan saptama formatını seçmek için **detection format** (saptama formatı) öğesini seçin.
- Not:** Real-time RT-PCR programının 5 adımının her birinde 1,6°C/sn'lik özel bir artış hızı kullanın.
- Not:** Veri edinme, bağlanma/uzatma adımı sırasında gerçekleştirilmelidir.
- Not:** Lütfen daha ayrıntılı bilgi için *cobas z 480 Kullanım Talimatları* belgesine bakın.
16. Plakayı gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirin (PCR plaka düzeninin bir örneği Şekil 5'te sunulmuştur).
17. Çalışmayı başlatın.
18. Çalışmanın sonunda sonuçları analiz edin (bkz. Sonuçlar bölümü).

Tablo 13. cobas z 480 için SARS-CoV-2 Prep&Amp UM programı

| Adımlar | Süre | Sıcaklık (°C) | Artış Hızı (°C/sn) | Döngü sayısı | Analiz Modu |
|-------------------------|--------|---------------|--------------------|--------------|---------------|
| Ters Transkripsiyon | 10 dak | 50 | 1,6 | 1 | Yok |
| PCR ilk ısı aktivasyonu | 2 dak | 95 | 1,6 | 1 | Yok |
| 2 adımlı döngüleme | | | | 40 | Kantifikasyon |
| Denatürasyon | 5 sn | 95 | 1,6 | | Hiçbiri |
| Birleştirme/Uzatma | 30 sn | 58 | 1,6 | | Tek |
| Soğuma | 1 dak | 37 | 1,6 | 1 | Yok |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | PC | | | | | | | | | | | |
| B | NTC | | | | | | | | | | | |
| C | NBC | | | | | | | | | | | |
| D | Örnek 1 | | | | | | | | | | | |
| E | Örnek 2 | | | | | | | | | | | |
| F | Örnek 3 | | | | | | | | | | | |
| G | ... | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Şekil 5. cobas z 480'de plaka düzeni örneği

Protokol: QuantStudio 5 Dx'te Örnek Hazırlama ve SARS-CoV-2 Saptaması

Bu protokol, QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR cihazında, taşıma besiyerinde saklanan insan nazal, nazofaringeal veya orofaringeal sürüntülerinde ve seyreltilmemiş tükürük örneklerinde 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 RNAzlar ile kontaminasyondan kaçınmaya ve nükleaz içermeyen plastik malzemeler kullanmaya özen gösterin.
- QuantStudio 5 Dx kullanırken, ilk kullanımdan önce master karışım tüpüne ROX boyası eklenmelidir.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Solunum örnekleri, hazırlama adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında saklanabilir; ancak buz üstünde veya 4°C'de soğutma rafında saklanması önerilir.
- Tükürük örneği buz üstünde veya 4°C'de buz üstünde tutulabilir ancak bunların hazırlık adımları ve reaksiyon kurulumu sırasında oda sıcaklığında (15-25°C) tutulması önerilir.
- QuantStudio 5 kullanılırken ROX boyası gereklidir.
- 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 15-25°C'de 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 RNAzları inhibe eder ancak virüs inaktive edici bir çözelti değildir. Tüm örneklerle tehlikeli olabileceği düşünülmektedir.
- Real-time RT-PCR platformunun döngüleme koşullarının bu protokolda belirtilen şekilde olduğunu doğrulayın.
- Birden fazla dondurma-çözdürme döngüsünden kaçınmak için reaktiflerden alikot alınabilir.
- Reaksiyon karışımını taze olarak hazırlayın (real-time RT-PCR plaka başlangıcına <2 saat).
- Kontaminasyonu en aza indirmek için örnek ve real-time RT-PCR hazırlama ayrı bölgelerde yapılmalıdır.

Prosedür

Örnek hazırlama: Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler) için Adım 1'i izleyin. Tükürük numuneleri için Adım 2'ye geçin.

1. Solunum yolu numuneleri (nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntüler):
 - 1a. Örneği içeren sürüntüyü kuvvetle vorteksleyin.
 - 1b. 50-200 µl örnek alikotunu 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüplere alın
 - 1c. Bir ısıtma bloğunda 70°C'de 10 dakika ısıtma adımıyla gerçekleştirin.
 - 1d. Örnekleri buz üstünde en az 5 dakika boyunca soğutun, ardından örnekleri 4°C'de buz üstünde saklayın.
2. Tükürük örnekleri:
 - 2a. Sıvılaştırma (pipetlemeyi kolaylaştırmak için): tükürük örneğini 15 dakika boyunca 95 °C'ye ısıtın (belirtilmemiş hacim, kap veya ısıtma cihazı).
 - 2b. Örneği 8-10 kez nazikçe yukarı ve aşağı pipetleyerek homojen hale getirin.
 - 2c. 50 µl örnek alikotunu 1,5 ml'lik PCR içermeyen bir tüpe alın.
 - 2d. Bir ısıtma bloğunda 15 dakika boyunca 95°C'ye ısıtma adımıyla gerçekleştirin, ardından örneği, PCR kuyusu veya tüpüne yükleyene kadar en az 5 dakika boyunca RT'de tutun.
3. İlk kullanımda, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı ROX Reference Dye ile tamamlayın.
 - 3a. Bir tüp SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'a 32,8 µl ROX boyası ekleyin.
 - 3b. SARS-CoV-2 UM Amp Buffer ve ROX boyası içeren kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin.

- 3c. Tüpün dibinde ROX boyası içeren SARS-CoV-2 UM Amp Buffer'ı döndürerek aşağı indirin.
4. Tam QuantStudio 5 Dx plakası (96 kuyulu) için SARS-CoV-2 Amp Primers ile SARS-CoV-2 Internal Control için bir alikot karışımı hazırlayın.
- 4a. SARS-CoV-2 Amp Primers ve SARS-CoV-2 Internal Control'un gerekli hacimlerini Tablo 14'e göre yeni bir 1,5 mL'lik PCR içermeyen tüpe aktarın.
- 4b. Kapağı kapatın ve tüpü 3 kez ters çevirin veya tüpü 3-5 sn puls vorteksleyin.
- 4c. Çözeltiyi tüpün dibine getirmek için IC'yi içeren SARS-CoV-2 Amp Primers'ı aşağı doğru döndürün.

Tablo 14. SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı kurulumu

| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|---|---------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+ %20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 Amp Primers | 3,45x | 1x | 7,25 | 835,2 |
| SARS-CoV-2 Internal Control | 166,67 cp/µl | 10 cp/µl | 1,5 | 172,8 |
| Toplam SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | | | 8,75 | 1008 |

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

5. Tablo 15'e göre bir reaksiyon karışımı hazırlayın ve tüpü 3 kez ters çevirerek iyice karıştırın.

Tablo 15. Reaksiyon karışımı kurulumu

| RT-PCR reaksiyon karışımı | | | Reaksiyon sayısı Hacim (µl) | |
|---|---------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Reaktifler | Stok konsantrasyonu | Son konsantrasyon | 1 rxn | 96 rxn (+%20 ekstra hacim*) |
| SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX karışımı | 4x | 1x | 6,25 | 720 |
| SARS-CoV-2 Amp Primers + IC karışımı | 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 hacimlerini test edilecek örnek sayısına göre ayarlayın. Ölü hacmi telafi etmek için ekstra hacmi değerlendirin.

6. 8 µl nükleaz içermeyen suyu NEC'ye atanan kuyuya dağıtın.
7. 10 µl nükleaz içermeyen suyu NTC'ye atanan kuyuya yükleyin.

8. 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer'ı NEC'ye atanan her kuyuya ve hazırlanan örneklerle dağıtın.
9. 8 µl hazırlanmış örneği SARS-CoV-2 UM Prep Buffer'ı içeren bir kuyuya ekleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
10. Adım 5'te hazırlanan reaksiyon karışımından 15 µl'yi örneklerle ve kontrollere ayrılan kuyulara ekleyin (Şekil 6 örnek olarak sunulmuştur). Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
11. 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control uygun kuyuya yükleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak 5 kez karıştırın.
12. Çapraz kontaminasyonu önlemek için PCR plakasını iyice kapatın. Ayrı kuyularda sıkı bir mühür elde etmek için tüm plakaya homojen şekilde basınç uyguladığınızdan emin olun.
13. Sıvıyı kuyunun alt kısmında toplamak için PCR plakasını kısa süre santrifüjleyin.
14. **İlk kullanım:** Şablon, QuantStudio 5 Dx TD yazılım sürümü 1.0.1 veya üzerinde oluşturulmalı ve çalışma, QuantStudio 5 Dx IVD yazılımında başlatılmadan önce yayınlanmalıdır. Şablonu uygun şekilde ayarlayın:
Not: Properties (Özellikler) sekmesinde, **Experiment type** (Deney tipi) seçeneğini **Standard Curve** (Standart Eğri) olarak ve **Run mode** (Çalışma modu) seçeneğini **Standard** (Standart) olarak yapılandırın.
Not: Method (Yöntem) sekmesinde, 25 µl reaksiyon hacmi için real-time RT-PCR programını ayarlayın (Tablo 16).
Not: Veri edinme, bağlanma/uzatma adımı sırasında gerçekleştirilmelidir.
Not: Plate (Plaka) sekmesinde, **Passive Reference** (Pasif Referans) olarak **ROX** ögesini seçin ve FAM, VIC ve Cy5'i Baskılayıcı Bulunmayan Hedefler olarak (**None** (Hiçbiri)) ögesini seçin) ayarlayın.
Not: Lütfen daha ayrıntılı bilgi için *QuantStudio 5 Dx Kullanım Talimatları* belgesine bakın.
15. QuantStudio 5 Dx IVD Yazılımında, önceden Adım 14'te oluşturulan şablonu yükleyin. Kullanılan kuyuları seçin ve FAM, VIC ve Cy5 Hedeflerini uygulayın.

16. Plakayı gerçek zamanlı döngüleyiciye yerleştirin (PCR plaka düzeninin bir örneği Şekil 6'da sunulmuştur).
17. Çalışmayı başlatın.
18. Çalışmanın sonunda sonuçları analiz edin (bkz. Sonuçlar bölümü).

Tablo 16. QuantStudio 5 Dx için SARS-CoV-2 Prep&Amp UM programı

| Aşama | Adım | Süre | Sıcaklık (°C) | Döngü sayısı | Edinim |
|-------|----------------------------|--------|---------------|--------------|-----------------|
| Tutma | 1. Ters Transkripsiyon | 10 dak | 50 | 1 | Hayır |
| | 2. PCR ilk ısı aktivasyonu | 2 dak | 95 | 1 | Hayır |
| PCR | 2 adımlı döngüleme | | | 40 | |
| | Denatürasyon | 5 sn | 95 | 1 | Hayır |
| | Birleştirme/Uzatma | 30 sn | 58 | 1 | FAM, VIC ve Cy5 |

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

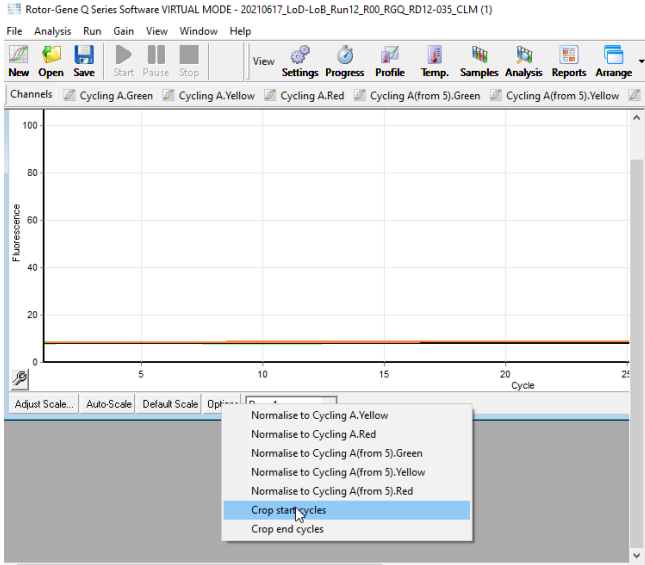
Şekil 6. QuantStudio 5 Dx'te plaka düzeni örneği

Sonuçlar

RGQ MDx 5plex HRM'de analiz

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).

Veri analizi için döngüleri kırma özelliği kullanılmalıdır (Şekil 7): **Cycling A.Green** Ham Kanalını açın. **Options** (Seçenekler) > **Crop Start Cycles** (Başlangıç Döngülerini Kır) öğesine gidin ve iletişim kutusuna **5** değerini girin. **Cycling A(from 5).Green** adında yeni bir kanal oluşturulur. Aynısı, **Cycling A(from 5).Red** ve **Cycling A(from 5).Yellow** kanallarını oluşturmak üzere Red ve Yellow ham kanalları için de yapılmalıdır.



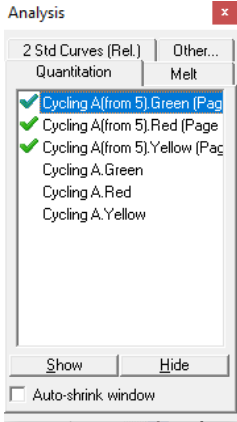
Şekil 7. RGQ MDx 5plex HRM çalışma analizine yönelik olarak döngü kırma ayarının ekran görüntüsü

Analiz menüsünü (Şekil 8) açın ve oluşturulan her bir Cycling A(from 5) kanalı için, farklı analizler arasında tutarlılık sağlamak adına aşağıdaki analiz parametrelerini **uygulayın** (Tablo 17).

Tablo 17. 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 |
| Kırpılmış 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. Veriler, virgülle ayrılan değer metni (.csv) formatında dışa aktarılabilir: RGQ Yazılımı penceresinde, **File (Dosya) > save as (farklı kaydet) > Excel analysis sheet** (Excel analiz sayfası) öğesini seçin. Sonuçları dışa aktarmadan önce tüm örneklerin seçildiğinden emin olun (Şekil 8).



Şekil 8. Analiz parametrelerini uygulamak ve sonuçları dışa aktarmak için seçilen kanalların ekran görüntüsü (RGQ MDx 5plex HRM çalışma analizi).

ABI 7500 Fast Dx'te analiz

ABI 7500 Fast Dx'te veriler, üreticinin talimatlarına göre 7500 Fast Sistem Yazılımı sürüm 1.4.1 (veya üzeri) ile analiz edilir. **setup** (ayar) sekmesinde, kuyu grubunu veya analizde bulunan plakanın tamamını seçin ve kuyu denetleyici pencerelerini açmak için sağ tıklayın. 3 florofor (FAM, VIC ve Cy5) seçilmeli ve **Passive reference** (Pasif referans) olarak **ROX** seçilmelidir. Aşağıdaki parametreler, farklı analizler arasında tutarlılık için gereklidir (Tablo 18).

Tablo 18. ABI 7500 Fast Dx için analiz parametreleri

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

ABI SDS yazılımında, seçilen kuyu grubunun veya plakanın tamamının Ct değerleri **Results** (Sonuçlar) ana bölümünün **data** (veri) sayfasında mevcuttur. Veriler, virgülle ayrılan değer metni (.csv) formatında 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.

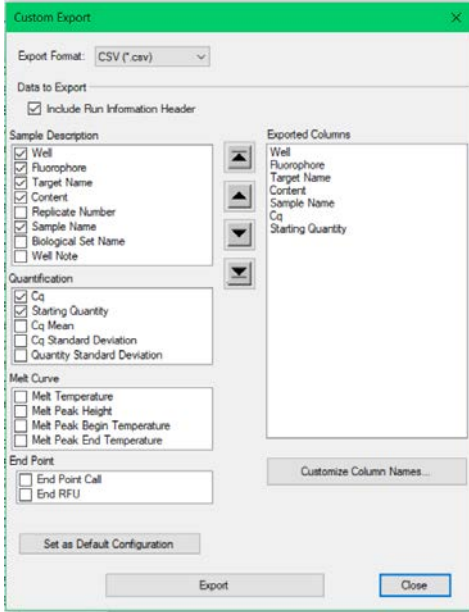
CFX96 Dx'te analiz

CFX96 Dx'te veriler, üreticinin talimatlarına göre CFX Manager Dx Yazılımı sürüm 3.1.3090.1022 (veya üzeri) ile analiz edilir. Deneyde kullanılan tüm kuyular için FAM, HEX ve Cy5 seçilmelidir. Aşağıdaki parametreler, farklı analizler arasında tutarlılık için gereklidir (Tablo 19).

Tablo 19. CFX96 Dx için analiz parametreleri

| Kanallar | FAM | HEX | Cy5 |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------|
| Cq belirleme modu: Tek eşik | Evet | Evet | Evet |
| Referans Ayarı: | | | |
| • çıkartılmış eğri uydurma | Evet | Evet | Evet |
| • Floresans sapma düzeltmesi uygulama | Evet | Evet | Evet |
| Eşik (RFU) | 250 | 300 | 100 |
| Kesme döngüleri | Ct >39,00, 40,00 olarak kabul edilir | Ct >35,00, 40,00 olarak kabul edilir | Hayır |

CFX manager Dx yazılımında, seçilen kuyu grubunun veya plakanın tamamının Ct değerleri (yazılımda **Cq** olarak adlandırılır) **Quantification Data** (Kantifikasyon Verileri) bölümünün veri sayfasında mevcuttur. Veriler, **Export** (Dışa Aktar) > **Custom Export** (Özel Dışa Aktar) seçilerek ve parametreler Şekil 9'a göre ayarlanarak virgülle ayrılan değer metni (.csv) olarak dışa aktarılabilir.



Şekil 9. CFX96 Dx için ham veri dosyası parametreleri

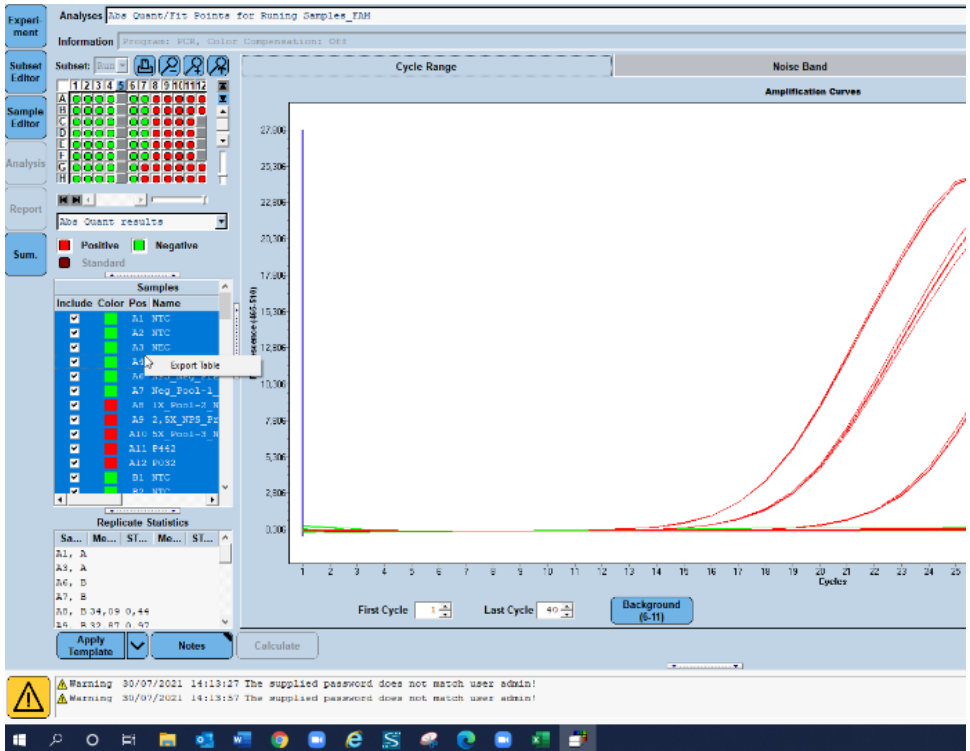
cobas z 480'de analiz

cobas z 480'de veriler, üreticinin talimatlarına göre LightCycler 480 SW UDF sürüm 2.0.0 (veya üzeri) ile analiz edilir. Yalnızca deneyde kullanılan kuyularla olmak üzere, örneklerin bir alt setini oluşturun. Her bir kanal için, bir **Abs Quant/Fit Points** (Mutlak Kantifikasyon/Uyum Noktaları) Analiz sayfası oluşturun ve farklı deneyler arasında tutarlılık sağlamak için aşağıdaki parametreleri kullanın (Tablo 20).

Tablo 20. cobas z 480 için analiz parametreleri

| Kanallar | FAM (465-510) | HEX (540-580) | ATTO647N (610-670) |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Cycle range (Döngü aralığı) sekmesi | 1-40 | 1-40 | 6-40 |
| • Birinci - Son döngü | | | |
| • Arka plan | 5/10 | 5/10 | 6/11 |
| Noise band (Gürültü bandı) sekmesi | STD Çarpıcı | STD Çarpıcı | STD Çarpıcı |
| • Yöntem | | | |
| • STD Çarpıcı değeri | 50 | 40 | 25 |
| Analysis (Analiz) sekmesi | 2 | 2 | 2 |
| • Uyum noktaları | | | |
| • Eşik yöntemi | Otomatik | Otomatik | Otomatik |
| Kesme döngüsü | Ct >39,00, 40,00 olarak kabul edilir | Ct >35,00, 40,00 olarak kabul edilir | Hayır |

LightCycler 480 SW UDF sürüm 2.0.0'da (veya üzeri), seçilen bir kuyu grubunun veya plakanın tamamının Ct değerleri (yazılımda **Cp** olarak adlandırılır) **analysis** (analiz) bölümünde mevcuttur (Şekil 10). Veriler, sonuç tablosuna sağ tıklayıp **Export table** (Tabloyu dışa aktar) öğesi seçilerek kanala göre metin dosyası (.txt) formatında dışa aktarılabilir.



QuantStudio 5 Dx'te analiz

QuantStudio 5 Dx'te veriler, üreticinin talimatlarına göre QuantStudio 5 Dx IVD Yazılımı sürüm 1.0.1 (veya üzeri) ile analiz edilir. **Assign Targets and Samples** (Hedefleri ve Örnekleri Ata) penceresinde, deneyde kullanılan tüm kuyular için 3 florofor (FAM, VIC ve Cy5) seçilmeli ve **Passive reference** (Pasif referans) olarak **ROX** seçilmelidir. Aşağıdaki parametreler, farklı analizler arasında tutarlılık için gereklidir (Tablo 21).

Tablo 21. QuantStudio 5 Dx için analiz parametreleri

| Kanallar | FAM | VIC | Cy5 |
|-----------------|---|---|----------|
| Pasif boya | ROX | ROX | ROX |
| Floresans eşiği | 0,21 | 0,062 | 0,04 |
| Referans çizgi | Otomatik | Otomatik | Otomatik |
| Kesme döngüleri | Ct >39,00, 40,00 olarak kabul edilir | Ct >35,00, 40,00 olarak kabul edilir | Hayır |

Veriler çalışma sayfası veya metin (.xls, .xlsx, .txt) olarak dışa aktarılabilir. QuantStudio 5 Dx IVD Yazılımı penceresinin **Export** (Dışa Aktar) sekmesinde **content** (içerik) bölümünde tüm seçenekleri seçin ve **unify the above content into one file** (yukarıdaki içeriği tek dosyada birleştir) seçeneğini seçin.

Sonuçların Yorumlanması

Pozitif kontrol (Positive Control, PC), N1 ve N2 genleri, RGQ MDx 5plex HRM ile Green floresans kanalında veya ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ve QuantStudio 5 Dx'te floresan FAM kanalında saptanır.

RNaz P'den oluşan örnekleme kontrolü, RGQ MDx 5plex HRM ile Yellow floresans kanalında veya ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ve QuantStudio 5 Dx 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 Yellow kanalındaki bir sinyal göz ardı edilebilir çünkü Green kanalındaki güçlü floresans sinyali Yellow kanalına 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 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ve QuantStudio 5 Dx ile Cy5/ATTO647N floresans kanalıyla klinik örneklerde saptanır. Bir real-time RT-PCR çalışmasının geçerli olması için (Tablo 22, Tablo 23) içinde gösterildiği şekilde PC, NTC ve NEC kontrolleri gerçekleştirilmelidir.

Tablo 22. RGQ MDx 5plex HRM için çalışma geçerlilik kriterleri ve sonuç yorumlama

| Kontrol | Green kanalda saptama | Yellow kanalda saptama | Red kanalda saptama | Yorumlama |
|---|---|------------------------|---------------------|----------------------|
| Pozitif kontrol (Positive Control, PC) | Ct ≤38,00 | İndiferant | İndiferant | PC geçerlidir. |
| | Ct >38,00 veya Ct yok | İndiferant | İndiferant | PC geçersizdir. |
| Şablonsuz kontrol (No Template Control, NTC) veya | Ct >38,00 veya Ct yok | Ct > 35,00 veya Ct yok | Evet | NTC/NEC geçerlidir. |
| Ekstraksiyonsuz kontrol (No Extraction Control, NEC) | Green veya Yellow'da amplifikasyon ile diğer kombinasyonlar | | İndiferant | NTC/NEC geçersizdir. |

Tablo 23. ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ve QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR cihazları için çalışma geçerlilik kriterleri ve sonuç yorumlaması

| Kontrol | FAM boyasında saptama* | VIC/HEX boyasında saptama* | Cy5/ATTO647N boyasında saptama* | Yorumlama |
|---|--|----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Pozitif kontrol (Positive Control, PC) | Ct ≤39,00 | İndiferant | İndiferant | PC geçerlidir. |
| | Ct >39,00 veya Ct yok | İndiferant | İndiferant | PC geçersizdir. |
| Şablonsuz kontrol (No Template Control, NTC) veya Ekstraksiyonsuz kontrol (No Extraction Control, NEC) | Ct >39,00 veya Ct yok | Ct >35,00 veya Ct yok | Evet | NTC/NEC geçerlidir. |
| | FAM veya VIC/HEX içinde amplifikasyon ile başka herhangi bir kombinasyon | | İndiferant | NTC/NEC geçersizdir. |

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

Tablo 24. RGQ MDx 5plex HRM için örnek geçerlilik 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. Real-time RT-PCR reaksiyonu inhibe edildi. Tekrar test gereklidir. |

Tablo 25. ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 ve QuantStudio 5 Dx real-time RT-PCR cihazları için örnek geçerlilik kriterleri ve sonuç yorumlaması.

| FAM boyasında saptama* | VIC/HEX boyasında saptama* | Cy5/ATTO647N 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. Real-time RT-PCR reaksiyonu inhibe edildi. Tekrar test gereklidir. |

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 real-time RT-PCR platformunun kullanım kılavuzuna (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 veya QuantStudio 5 Dx) harfiyen uyulması gerekir.
- Tüm bileşenlerin etiketleri ve kutusunda basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.
- Solunum enfeksiyonu belirti ve semptomları olmayan hastalardan alınan tükürük numuneleri bu testin performansı belirlenmemiştir.
- Tüpte kan izleri gözlemlendiğinde düşük pozitif bir klinik örneğin test edilmesi durumunda yanlış negatif sonuç riskini önlemek için bu durum kayda alınmalıdır ve örnek, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit kullanıldığında negatif sonuç verirse hastadan yeniden örnek alınmalı ve *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ile yeniden test edilmelidir.

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 ve sıvılaştırılmış seyreltilmemiş tükürük örneklerinin seri dilüsyonları analiz edilerek değerlendirilmiştir. LoD deneyleri için her bir numuneye yönelik iki örnek havuzu kullanılmıştır. Elde edilen LoD konsantrasyonunu onaylamak için, tüm tekrarların tespit oranı ≥ 95 olmalıdır (tekrarların en az 19/20'si pozitif sinyal üretmelidir).

LoD konsantrasyonu, öne sürülen real-time RT-PCR platformlarındaki (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx ve cobas z 480) nazofaringeal ve seyreltilmemiş tükürük numunelerinde doğrulanmıştır.

Nazal, orofaringeal ve nazofaringeal örnekler

LoD; RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx ve QuantStudio 5 Dx için 950 cp/ml olarak ve cobas z 480 için 475 cp/ml olarak öne sürülmüştür (bkz. Tablo 26)

Seyreltilmemiş tükürük örnekleri

LoD, RGQ MDx için 950 cp/ml olarak ve ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx ve CFX96 Dx için 1200 cp/ml olarak öne sürülmüştür (bkz. Tablo 26).

Tablo 26. Her bir real-time RT-PCR platformu için LoD sonuçları özeti

| Platform | Numune tipi | Doğrulanmış LoD (cp/ml) |
|------------------|------------------------|-------------------------|
| RGQ MDx | NPS | 950 |
| | Seyreltilmemiş tükürük | 950 |
| ABI 7500 Fast Dx | NPS | 950 |
| | Seyreltilmemiş tükürük | 1200 |
| QuantStudio5 Dx | NPS | 950 |
| | Seyreltilmemiş tükürük | 1200 |
| cobas z 480 | NPS | 475 |
| | Seyreltilmemiş tükürük | 1200 |
| CFX96 Dx | NPS | 950 |
| | Seyreltilmemiş tükürük | 1200 |

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

Dahil olma

artus SARS-CoV-2 Amp Primers ve Probes ürünlerinin dahil olma değeri, GISAID veri tabanında (www.gisaid.org) bulunan sekanslar üzerinde *in silico* analiz yapılarak değerlendirilmiştir. COVID CG'de (<https://covidcg.org>), destekleyici GISAID meta verileriyle toplam 722.488 sekans (23/03/2021'de mevcut) analiz edilmiştir. 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 Proplarının 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

In siliko analiz

artus SARS-CoV-2 Amp Primers ve Probes ürünlerinin 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 Primers and Probes, 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 (Tablo 27) analiz edilmiştir. Patojen sekansları NCBI veri tabanından alınmıştır ancak bu patojenlerden hiçbirisi *in siliko* amplifikasyon göstermemiştir. Tablo 27'de, *in siliko* test edilen patojenlerin listesi gösterilmektedir.

Tablo 27. *In siliko* test edilen patojenlerin listesi.

| Patojenler | Suş/Tip | Taksonomi Kimliği | <i>In siliko</i> PCR sonuçları |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|
| Adenovirüs Tip 3 | Tip 3 | 45659 | Eşleşme yok |
| Adenovirüs Tip 4 | Tip 4 | 28280 | Eşleşme yok |
| Adenovirüs Tip 5 | Tip 5 | 28285 | Eşleşme yok |
| Adenovirüs Tip 7A | Tip 7A | 85755 | Eşleşme yok |
| Adenovirüs Tip 14 | Tip 14 | 10521 | Eşleşme yok |
| Adenovirüs Tip 31 | 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 |
| Enterovirüs | Tip 68 | 42789 | Eşleşme yok |

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

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

(Devamı bir sonraki sayfadadır)

Tablo 27. (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 Primers ile ≥ 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 hiçbirisi *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 (Tablo 28). 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 x LoD'de inaktif SARS-CoV-2 partikülleri (Zeptomatrix) eklenmiş negatif nazofaringeal sürüntülere eklenerek hazırlanmıştır. NATrol™ Panelleri ve SARS-CoV-1'e doğrudan 2,87 x LoD'de inaktif SARS-CoV-2 viral partikülleri (Zeptomatrix) eklenmiştir. Test edilen her bir mikroorganizma havuzunun sonuçları ve ilgili konsantrasyonlar aşağıda özetlenmiştir.

Tablo 28'de, mikrobiyal etkileşimi test edilen patojenlerin listesi gösterilmektedir.

Tablo 28. 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 | |
| | İnsan koronavirüsü 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 28 (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 RSVA | 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 28 (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 yol |
| | 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 yol |
| | 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 yol |
| | 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 yol |
| | SARS-CoV-1 | Zeptomatrix (NATSARS-ST) | Bilinmiyor* | Uygulanamaz | |

* Konsantrasyon tedarikçi tarafından belirtilmemiştir.

Olumsuz etkileyen maddeler

Nazal, orofaringeal ve nazofaringeal sürüntü örnekleri

Olumsuz etkilediği kabul edilen maddelerin (Tablo 29'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 (Zeptomatrix) 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. Green ve Red 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 29, test edilen maddelerden hiçbirinin, Green floresans kanalında *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit performansını olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.

Tablo 29. Olumsuz etkileyen maddelerin listesi ve Green kanalında elde edilen doğruluk oranları.

| Olumsuz etkileyen maddeler | İşlev | Test edilen konsantrasyon | Negatif nazofaringeal sürüntüdeki Doğruluk Oranı sonuçları | Pozitif (4x LoD) nazofaringeal sürüntüdeki doğruluk oranı sonuçları |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|---|
| Tobramisin | Sistemik antibiyotik | 1 mg/ml | Etkileşim yok 0/15 | Etkileşim yok 15/15 |
| Mupirosin | Nazal antibiyotik merhem | 6,6 mg/ml | Etkileşim yok 0/15 | Etkileşim yok 15/15 |
| Flutikazon | Nazal kortikosteroid | %5 (h/h) | Etkileşim yok 0/15 | Etkileşim yok 15/15 |
| Mentol (Boğaz pastilleri) | Oral anestezi ve analjezik | 0,5 mg/ml | Etkileşim yok 0/15 | Etkileşim yok 15/15 |
| Oksimetazolin | Nazal sprey | %10 (h/h) | Etkileşim yok 0/15 | Etkileşim yok 15/15 |

Devamı bir sonraki sayfadır

Tablo 29 (bir önceki sayfadan devam etmektedir)

| Olumsuz etkileyen maddeler | İşlev | Test edilen konsantrasyon | Negatif nazofaringeal sürüntüdeki Doğruluk Oranı sonuçları | Pozitif (4x LoD) nazofaringeal sürüntüdeki doğruluk oranı sonuçları |
|---|----------------|---------------------------|--|---|
| Oseltamivir | Antiviral ilaç | 3,3 mg/ml | Etkileşim yok 0/15 | Etkileşim yok 15/15 |
| Müsin (Bovine submaksiller bezi tip I-S) | | 2,5 mg/ml | Etkileşim yok 0/15 | Etkileşim yok 15/15 |
| Tam Kan | | %4 (h/h) | Etkileşim yok 1/15* | Etkileşim yok 15/15 |

* Bir artefakta karşılık gelen bir amplifikasyon saptanmıştır.

Seyreltilmemiş tükürük örnekleri

Olumsuz etkilediği kabul edilen sekiz maddenin (Tablo 30'da listelenen maddeler için) *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit performansı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Testler, iki dilüsyon seviyesi gerçekleştirmek üzere ikiye bölünen 1 adet negatif seyreltilmemiş tükürük örneği havuzunda gerçekleştirilmiştir: (1) negatif seyreltilmemiş tükürük örnekleri ve (2) klinik performansı oluşturulmuş pozitif seyreltilmemiş tükürük örnekleri (negatif havuza, 3x LoD (3600 cp/ml) seviyesinde inaktif SARS-CoV-2 viral partikülleri (Zeptomatrix) eklenerek elde edilmiştir). Seyreltilmemiş tükürük örnekleri, bir ticari kit ile 3 operatör tarafından cobas z 480 platformu ile test edilmiştir.

Her bir olumsuz etkileyen madde için örnek tekrarları, bir çözücü içinde çözülmüş olumsuz etkileyen maddeyi (test örneği) veya tek başına çözücüyü (kontrol örneği) test etmek üzere 2'ye ayrılmıştır. Green, Red ve Yellow 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.

Kalitatif (örnek durumu) analiz bakımından, test edilen sekiz olumsuz etkileyen madde (bkz. Tablo 30), pozitif ve negatif tükürük örneklerinde *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit sonucunu etkilememektedir.

Tablo 30, test edilen maddelerden hiçbirinin, Green floresans kanalında *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit performansını olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.

Tablo 30. Olumsuz etkileyen madde listesi ve Green kanalında elde edilen doğruluk oranları.

| Olumsuz etkileyen madde* | İşlev | Test Edilen Konsantrasyon | Negatif seyreltilmemiş tükürük örneklerinde Doğruluk Oranı Sonuçları | Pozitif (3 ila 5x LoD) seyreltilmemiş tükürük örneklerinde Doğruluk Oranı Sonuçları |
|--|--|---------------------------|--|---|
| Tam kan | Endojen madde: İnsan gDNA'sı, lökositler, eritrositler | %1 h/h | Etkileşim yok* 0/8 | Etkileşim yok* 8/8 |
| Altoids® | Şeker | %2 a/h | Etkileşim yok 0/8 | Etkileşim yok 8/8 |
| Aspirin | Antienflamatuvar ilaç | %1 a/h | Etkileşim yok 0/8 | Etkileşim yok 8/8 |
| Listerine® | Antiseptik gargara | %1 h/h | Etkileşim yok 0/8 | Etkileşim yok 8/8 |
| Ricola® | Şeker | %1 a/h | Etkileşim yok 0/8 | Etkileşim yok 8/8 |
| Colgate® Total SF Whitening™ Diş Macunu | Diş beyazlatma özellikli diş macunu | %0,1 a/h | Etkileşim yok 0/8 | Etkileşim yok 8/8 |
| Tussidane® Sirop | Kuru öksürük için ilaç | %1 h/h | Etkileşim yok 0/8 | Etkileşim yok 8/8 |
| Pulmofluide® | Balgamlı öksürük için ilaç | %1 h/h | Etkileşim yok 0/8 | Etkileşim yok 8/8 |

* Tam kanda, Red kanalında IC tespiti için, örnek geçerliliği etkilenmeksizin olumsuz bir etki gözlemlenmiştir (inhibisyonun %10-40'ı). Green kanalında, örnek durumu tam kandan etkilenmemiştir ancak hafif bir Ct sapması gözlemlenmiştir (kontrol örneğine kıyasla tam kan ile ortalama 1,35 Ct daha sonra).

Tüpte kan izleri gözlemlendiğinde düşük pozitif bir klinik örneğin test edilmesi durumunda yanlış negatif riskini önlemek için bu durum kayda alınmalıdır ve örnek, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit kullanıldığında negatif sonuç verirse hastadan yeniden seyreltilmemiş tükürük alınmalı ve örnek, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ile yeniden test edilmelidir.

Örnek stabilite çalışması

Örnek stabilite çalışması, farklı örnek saklama koşullarının, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kitlerinin kalitatif (doğruluk oranı analizi) ve kantitatif (Ct sapma analizi) sonuçları üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere gerçekleştirilmiştir. Deneyler, iki dilüsyon seviyesi analiz edilerek gerçekleştirilmiştir: (1) negatif örnekler ve (2) inaktif SARS-CoV-2 viral partiküllerinin eklenmesiyle elde edilen klinik performansı oluşturulmuş pozitif örnekler (Zeptomatrix). Örneklerin (tükürük ve NPS) stabilitesini doğrulamak için, tekrarların $\geq 95\%$ 'inin aynı doğruluk oranını vermesi ve her bir stabilite koşulu olduğunda 0 zaman noktasından $\leq 10\%$ bir Ct sapması şart koşulmuştur.

Nazal, orofaringeal ve nazofaringeal örnekler:

Test edilen farklı stabilite koşulları Tablo 31'de listelenmiştir. Testler 3 örnek havuzu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Negatif NPS örnekleri, 5x LoD (4750 cp/ml) klinik performansı oluşturulmuş pozitif NPS örnekleri ve üç lot BRS1 (N2 dizisi, 1000 cp/10µL), BRS2 (RNAse P gblock, 1000 cp/10µL) ve BRS3 (N1 dizisi, 1000 cp/10µL) parti salınım örneği ABI 7500 Fast Dx platformuyla test edilmiştir.

Kalitatif ve kantitatif analiz sonuçlarına bakıldığında, test edilen NPS örneği saklama koşulları doğruluk oranını etkilememiş (beklenen durumun aynısı tespit edilmiştir) ve *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kit'in sonuçlarında önemli Ct sapmalarına yol açmamıştır. Dolayısıyla, test edilen NPS örneklerinin tüm farklı saklama koşullarına rağmen kit performansı sabit kalmıştır (bkz. Tablo 31).

Tablo 31'de nazofaringeal örneklerin stabilite koşulları gösterilmektedir

Tablo 31. Nazofaringeal örnek stabilitesi koşulları.

| Koşullar | Örnek stabilitesi iddiası |
|-------------------|---------------------------|
| F/T | 3 F/T |
| 4°C (2°C ila 8°C) | 72 saat |
| -70°C | 2 hafta |

Seyreltilmemiş tükürük örnekleri

Test edilen farklı stabilite koşulları Tablo 32'de listelenmiştir. Testler 2 örnek havuzu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Negatif seyreltilmemiş tükürük örnekleri ve 3xLoD (3600 cp/ml) klinik performansı oluşturulmuş pozitif seyreltilmemiş tükürük örnekleri ABI 7500 Fast Dx platformuyla test edilmiştir.

Kalitatif ve kantitatif analiz sonuçlarına bakıldığında, test edilen saklama koşulları doğruluk oranını etkilememiş (beklenen durumun aynısı tespit edilmiştir) ve *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM kit'in sonuçlarında önemli Ct sapmalarına yol açmamıştır. Dolayısıyla, kitin performansı test edilen seyreltilmemiş tükürük örneklerinin farklı saklama koşullarına rağmen sabit kalmıştır.

Tablo 32'de seyreltilmemiş tükürük stabilite koşulları gösterilmektedir.

Tablo 32. Seyreltilmemiş Tükürük örnek stabilitesi koşulu

| Koşullar | Örnek stabilitesi iddiası |
|--|---|
| F/T | 3 F/T |
| RT (18°C ila 26°C) | 72 saat |
| 4°C (2°C ila 8°C) | 72 saat |
| Birleşik koşul: (6 saat RT'de, 72 saat 4°C'de (2 ila 8°C) ve 8 gün -20°C'de (-30°C ila -15°C)) | 6 saat RT'de, ardından 72 saat 4°C'de (2 ila 8°C), ardından 7 gün -20°C'de (-30°C to -15°C) |
| -20°C (-30°C ila -15°C) | 1 ay (30,5 gün) |

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, Green, Yellow ve Red kanallarında SARS-CoV-2 hedefleri için standart sapmayı (Standard Deviation, SD) ve varyasyon katsayısını (Coefficient of Variation, %CV) belirlemek için kullanılmıştır. Tablo 33, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in Green kanalında 0,63 SD (%2,03 CV), Yellow kanalında 0,54 SD (%2,22 CV) ve Red kanalında 1,28 SD (%4,10 CV) genel kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 33. *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 | 0,54 | 0,09 | 0,10 | 0,06 | 0,11 | 0,09 | 0,50 |
| Yellow kanal | (2,22) | (0,37) | (0,42) | (0,27) | (0,47) | (0,36) | (2,05) |
| Negatif NPS | 1,15 | 0,0 | 0,55 | 0,00 | 0,12 | 0,39 | 0,92 |
| Red kanal | (3,68) | (0,00)0 | (1,76) | (0,00) | (0,40) | (1,26) | (2,96) |
| Bozundurulmuş NPS | 0,63 | 0,18 | 0,31 | 0,00 | 0,08 | 0,00 | 0,51 |
| Green kanal | (2,03) | (0,59) | (1,00) | (0,00) | (0,25) | (0,00) | (1,64) |
| Bozundurulmuş NPS | 0,47 | 0,13 | 0,24 | 0,05 | 0,18 | 0,00 | 0,33 |
| Yellow kanal | (1,93) | (0,53) | (0,98) | (0,20) | (0,73) | (0,00) | (1,38) |
| Bozundurulmuş NPS | 1,28 | 0,12 | 0,58 | 0,11 | 0,00 | 0,49 | 1,02 |
| Red kanal | (4,10) | (0,37) | (1,84) | (0,34) | (0,00) | (1,57) | (3,27) |

Klinik Performans

Nazofaringeal sürüntüler

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp tahlilinin klinik performansı, taşıma besiyeri içinde geriye dönük nazofaringeal sürüntü numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir ve bunlar 150 klinik numuneden oluşmaktadır.

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 34, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in bir referans yöntemle karşılaştırmalı olarak performansını raporlamaktadır.

Tablo 34. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in bir referans yöntemle karşılaştırmalı olarak klinik performansı.

| Örnek Durumu | N | Pozitif %'si | %95 CI | Negatif %'si | %95 CI |
|--------------|----|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Pozitif | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9-99,7 | 1,9 (1/52) | - |
| Negatif | 98 | 5,1 (5/98) | - | 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 edilmiştir ve Tablo 35'te gösterilmektedir.

Tablo 35. Uyumsuz sonuç analizinden sonra *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in klinik performansı.

| Örnek Durumu | N | Pozitif %'si | %95 CI | Negatif %'si | %95 CI |
|--------------|----|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Pozitif | 52 | 98,1 (51/52) | 89,9-99,7 | 1,9 (1/52) | – |
| Negatif | 98 | 5,1 (5/98) | – | 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 nazofaringeal sürüntüler

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp tahlilinin klinik performansı, taşıma besiyeri içinde geriye dönük nazofaringeal sürüntü numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir ve bunlar 153 klinik numuneden oluşmaktadır.

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 23).

Tablo 36, *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 36. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in bir referans yöntemle karşılaştırmalı olarak klinik performansı

| Örnek Durumu | N | Pozitif %'si | %95 CI | Negatif %'si | %95 CI |
|--------------|----|-----------------|-----------|------------------|-----------|
| Pozitif | 50 | 64,0 (32/50) | 50,1-75,9 | 36,0 (18/50) | – |
| Negatif | 87 | 1,15 (1/87) | – | 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 edilmiştir ve Tablo 37'de gösterilmektedir.

Tablo 37. Uyumsuz sonuç analizinden sonra *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in klinik performansı

| Örnek Durumu | N | Pozitif %'si | %95 CI | Negatif %'si | %95 CI |
|--------------|-----|------------------|------------|--------------------|-----------|
| Pozitif | 32 | 100,0 (32/32) | 89,3-100,0 | 0 (0/32) | - |
| Negatif | 105 | 0,95 (1/105) | - | 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)

Seyreltilmemiş tükürük örnekleri

artus SARS-CoV-2 UM Prep&Amp tahlilinin klinik performansı, 142 tükürük numunesinden oluşmak üzere, seyreltilmemiş tükürük numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tüm numuneler COVID-19 enfeksiyonu belirti ve semptomları gösteren hastalardan alınmıştır. Klinik doğrulama ABI 7500 Fast Dx üzerinde gerçekleştirilmiştir. Örnek geçerlilik kriterlerine göre, her iki testin geçersiz bir duruma sahip olması nedeniyle *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ve ayrıca referans yöntemle test edildikten sonra on iki örnek analiz dışında bırakılmıştır.

Tablo 38, *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in bir referans yöntemle karşılaştırmalı olarak performansını raporlamaktadır.

Tablo 38. *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in bir referans yöntemle karşılaştırmalı olarak klinik performansı.

| Örnek Durumu | N | Pozitif %'si | %95 CI | Negatif %'si | %95 CI |
|--------------|----|------------------|-------------|----------------|--------------|
| Pozitif | 45 | 93,33 (42/45) | 82,14-97,71 | 6,67 (3/45) | -- |
| Negatif | 85 | 0 (0/85) | - | 100 (85/85) | 95,68-100,00 |

Üç 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 edilmiştir ve Tablo 39'da gösterilmektedir.

Tablo 39. Uyumsuz sonuç analizinden sonra *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit'in klinik performansı.

| Örnek Durumu | N | Pozitif %'si | %95 CI | Negatif %'si | %95 CI |
|--------------|----|------------------|-------------|----------------|--------------|
| Pozitif | 43 | 97,67 (42/43) | 87,94-99,59 | 2,32 (1/43) | -- |
| Negatif | 87 | 0 (0/87) | - | 100 (87/87) | 95,68-100,00 |

İki yanlış negatif sonuç gerçek negatif olarak yeniden sınıflandırılırken, bir yanlış negatif sonuç ise yanlış negatif 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): $42/43 = \%97,67$ (%95 CI: %87,94 - %99,59)

Negatif Uyumluluk Oranı

(Negative Percent Agreement, NPA): $87/87 = \%100,00$ (%95 CI: %95,68 - %100,00)

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 (Positive Control, 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 (Green), örnekleme kontrolü için floresans kanalı HEX/VIC/JOE (Yellow) ve dahili kontrol için Cy5/Atto (Red) 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 yapılandırma sırasında real-time RT-PCR platformunun hatalı şekilde yapılandırılması. | Bu kılavuzda açıklanan şekilde real-time RT-PCR 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. |
|--|--|

Dahili Kontrolde 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. |
|--|---|

Yorum ve öneriler












- | | |
|---|---|
| b) Dahili kontrol bozunmuştur. | RNAz 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 yapılandırma sırasında real-time RT-PCR platformunun hatalı şekilde yapılandırılması. | Bu kılavuzda açıklanan şekilde real-time RT-PCR 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 yapılandırma sırasında real-time RT-PCR platformunun hatalı şekilde yapılandırılması. | Bu kılavuzda açıklanan şekilde real-time RT-PCR 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 |
| Rn | R, Kullanma Talimatı revizyonu olup n ise revizyon numarasıdır |
|  | Sıcaklık sınırlaması |
|  | Üretici |

Sembol**Sembol tanımı**

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 tubes, 0,1 ml for Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx | 72-well rotor, Strip tüpleri ve kapaklar ile kullanım için | 981103 |
| Rotor-Gene Q software | 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 |
| 72-Well Rotor | Strip Tubes and Caps, 0,1 ml ürünü için, 10-50 µl reaksiyon hacimleriyle | 9018903 |
| Locking Ring 72-Well Rotor | 72-Well Rotor içindeki Strip Tubes and Caps, 0,1 ml ürününü kilitlemek için | 9018904 |

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 | İstem Kapsamı: Test, asemptomatik bireylerde kabul görmüştür. Kullanım Amacı, COVID-19 enfeksiyonundan şüphelenilmesi için semptomlar veya başka nedenler bulunmayan kişiler dahil edilecek şekilde güncellenmiştir. Performans verilerine, asemptomatik bireyleri içeren klinik performans bölümü eklenmiştir. |
| R3, Eylül 2021 | <p>İstem Kapsamı:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tükürük numuneleri kullanılan testlerin eklenmesi.2. İş akışının değiştirilmesi.3. 3 ek platform ve bunların ilgili yazılımları ile kullanım: CFX Manager Dx Yazılım sürümü 3.1.3090.1022 (veya üzeri) ile CFX96 Dx, LightCycler 480 SW UDF sürüm 2.0.0 (veya üzeri) ile cobas z 480 ve QuantStudio 5 Dx IVD Yazılım sürümü 1.0.1 (veya üzeri) ile QuantStudio 5 Dx.4. Nazofaringeal, nazal ve orofaringeal sürüntü örneklerine ilişkin performans bölümüne 3 ek platformun (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) tespit sınırı eklenmiştir.5. Performans özellikleri bölümü güncellenmiştir.6. RGQ cihazı için yalnızca floresans kanalları (Green, Red, Yellow) tutulmuştur (parantez içindeki boya adları silinmiştir).7. CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 ve QuantStudio 5 Dx için yalnızca boya adları tutulmuştur.8. ABI7500 Fast Dx için A/1, B/2 ve E/5 floresans filtreleri silinmiştir. Yalnızca boya adları (Fam, Vic ve Cy5) tutulmuştur.9. Daha net bir sunum sağlamak için klinik performans bölümündeki Tablo 34-37'de değişiklikler. |

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 belirtilenlerin 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 edilmemiş veya optimize edilmemiştir. 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 edilenlerin 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 Mahkeme 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*®, Prep&Amp™, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™, Hard-Shell® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zeptomatrix®, NATtrol™ (Cole-Parmer); Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company); Listerine® (Johnson & Johnson); Tussidane® (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte); Pulmofluide® (Laboratoires Gerda); Excel® (Microsoft Corporation); Ricola® (Ricola Group); cobas®. LightCycler® (Roche Group); ABI®, MicroAmp™, EnduraPlate™, QuantStudio®, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific veya Bağlı Kuruluşları); Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Bu belgede geçen tescilli adlar, ticari markalar vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarca korunmaktadır.

09/2021 HB-2850-003 © 2021 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

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