

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit
K1180A



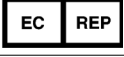
Kullanma Talimatları

In Vitro Tanı Amaçlı Kullanım içindir

Yalnızca İhracat içindir. Amerika Birleşik Devletleri'nde Satışı Yapılmayacaktır.

Revizyon B2, Mayıs 2022

Sembol Tablosu

	Avrupa Uyumu		Dikkat
	In Vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz		Katalog/kod numarası
	Üretici		Kullanma Talimatlarına Bakın
	Son kullanma tarihi		<N> testleri için yeterlidir
	Seri kodu		Yeniden kullanmayın
	Sıcaklık kısıtlaması		Benzersiz Cihaz Tanımlayıcı
	Avrupa Topluluğu'nda yetkili temsilci		

Satın Alana Bildirim: Sınırlı Lisans

Bu ürün, Agilent ve Life Technologies Corporation arasındaki lisans anlaşmaları altında satılmaktadır. Bu ürünün satın alma fiyatı, bu ürünle birlikte gelen kullanma talimatlarına uygun şekilde insanlarda SARS-CoV-2'ye yönelik *in vitro* testte kullanılmak üzere ürünün yalnızca bu miktarının kullanılması için Life Technologies Corporation firmasının sahip olduğu sınırlı, transfer edilemeyen hakları içerir. Başka bir hak verilmemektedir. Yukarıdaki patent altındaki satın alma lisanslarıyla ilgili daha fazla bilgi, Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 adresiyle irtibata geçilerek alınabilir. E-posta: outlicensing@lifetech.com.

1 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Ürün Bilgileri

Kullanım Amacı	6
Ürün Açıklaması	7
Ürüne Genel Bakış/Test İlkesi	7
Test Adımlarının Açıklaması	7
Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ile Kullanılacak Kontrol Materyalleri	7
Analiz İş Akışı	9

2 Materyaller, Güvenlik ve Kullanım

Temin Edilen Materyaller	11
Gerekli Olan Ancak Temin Edilmeyen Reaktifler, Materyaller, Ekipmanlar ve Yazılım	12
Güvenlik Önemleri	15
Saklama ve Kullanım	17
Ürün ambalajı	17
Reaktiflerin saklanması, kullanılması ve stabilitesi	17
Numunelerin alınması, kullanılması ve saklanması	17

3 Nükleik Asit Ekstraksiyonu için Talimatlar

Nükleik Asit Ekstraksiyonu	19
----------------------------	----

4 qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama Talimatları

Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR Deneyini Ayarlama	21
AriaMx/AriaDx deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)	21
AriaMx/AriaDx deneyini kayıtlı şablondan oluşturma	27
ABI 7500 Fast deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)	27
ABI 7500 Fast deneyini kayıtlı şablondan oluşturma	33
Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma ve ayarlama (kayıtlı protokol ve plaka dosyaları henüz oluşturulmamışsa gereklidir)	33
Kayıtlı protokol ve plaka dosyalarından Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma	39
qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama	41

5 qRT-PCR Gerçekleştirme Talimatları

Agilent AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme	45
AriaMx/AriaDx sisteminde qRT-PCR programını çalıştırma	45
AriaMx/AriaDx deneyi için veri analizi ayarları atama	46
Aria yazılımından verileri dışa aktarma	50
ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazında qRT-PCR Gerçekleştirme	53
ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazında qRT-PCR Programını Çalıştırma	53
ABI 7500 Fast deneyi için veri analizi ayarları atama	53
Design & Analysis yazılımından Kuyucuk Tablosu verilerini CSV dosyasına aktarma	57

Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme	60
CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde qRT-PCR programını çalıştırma	60
CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde veri analizi ayarları atama	60
CFX Maestro yazılımından verileri dışa aktarma	65

6 Analiz ve Sonuçlar

Sonuçların Yorumlanması	68
Kontrol örnekleri için sonuçlar ve yorumlama	68
Klinik örnekler için sonuçlar ve yorumlama	69

7 Kalite Kontrol

Kalite Kontrol	72
----------------	----

8 Analizin Kısıtlamaları

Kısıtlamalar	74
--------------	----

9 Performans Özellikleri

Performans Özellikleri	76
Analitik Hassasiyet (Tespit Sınırı)	76
Analitik Kapsayıcılık	77
Çapraz Reaktivite	77
Klinik Değerlendirme	77

10 Referans

Ürün Etiketleri	80
-----------------	----

1

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Ürün Bilgileri

Kullanım Amacı **6**

Ürün Açıklaması **7**

Analiz İş Akışı **9**

Bu bölümde, analizle ilgili giriş bilgileri verilmektedir.

Kullanım Amacı

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, COVID-19 klinik ve/veya epidemiyolojik kriterlerini karşılayan kişilerden alınan nazofaringeal (NP), nazal ve orofaringeal (OP) svab numunelerinden izole edilmiş ve saflaştırılmış SARS-CoV-2'de RNA'nın kalitatif tayini için tasarlanmış, gerçek zamanlı bir RT-PCR in vitro diyagnostik testtir.*

Sonuçlar, SARS-CoV-2 RNA'sının tanımlanması içindir. SARS-CoV-2 RNA genellikle enfeksiyonun akut evresinde üst solunum yolu numunelerinde tespit edilebilir. Pozitif sonuçlar, SARS-CoV-2 RNA varlığını işaret eder; hastanın enfeksiyon durumunun belirlenmesi için, hasta öyküsüyle ve diğer tanı bilgileriyle klinik ilişki gerekir. Pozitif sonuçlar, diğer virüslerle eş zamanlı enfeksiyonu veya bakteriyel enfeksiyonu ekarte etmez. Tespit edilen ajan, hastalığın kesin nedeni olmayabilir.

Negatif sonuçlar SARS-CoV-2 enfeksiyonunu dışlamaz ve hastanın yönetimiyle ilgili kararlar için yegane temel olarak kullanılmamalıdır. Negatif sonuçlar, diğer klinik gözlemler, hasta öyküsü ve epidemiyolojik bilgilerle birlikte değerlendirilmelidir.

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, Agilent sisteminin ve in vitro tanı prosedürlerinin işleyişinde özel talimat verilmiş ve eğitim almış vasıflı ve eğitilmiş klinik laboratuvar personeli tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

* Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit analizinin performansı, UTM veya VCM taşıma ortamında alınan nazofaringeal svab numune tipi kullanılarak belirlenmiştir. Orofaringeal svablar, nazal svablar ve orta türbinat nazal svabları, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit analiziyle kullanıma yönelik uygun numune tipleri olarak kabul edilir ancak bu numune tipleriyle performans belirlenmemiştir. Orofaringeal svablar, nazal svablar ve orta türbinat nazal svabların (bir sağlık uzmanının gözetiminde kendi kendine alınan ya da sağlık uzmanı tarafından alınan) testleri, COVID-19 semptomları olan hastalarla sınırlıdır.

Ürün Açıklaması

Ürüne Genel Bakış/Test İlkesi

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit gerçek zamanlı, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon (qRT-PCR) testidir. SARS-CoV-2 primer ve prob setleri, sağlık uzmanlarının COVID-19 şüphesi duyduğu hastalardan alınan nazofaringeal (NP), nazal ve orofaringeal (OP) svab numunelerinde SARS-CoV-2 RNA'nın tespit edilmesi için tasarlanmıştır.

Test Adımlarının Açıklaması

Otomatik ekstraksiyon sistemi kullanılarak (QIAAsymphony ile Qiagen QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit, KingFisher Flex ile ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit) yaklaşık 140-200 µl (ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak) nazofaringeal (NP) svab numunelerinden nükleik asitler izole edilir ve saflaştırılır. Saflaştırılan nükleik asit (5 µl) ters transkripsiyonla cDNA yapılır ve ardından, desteklenen gerçek zamanlı PCR cihazlarında Agilent Brilliant III qRT-PCR reaktifleri kullanılarak bir adımlı qRT-PCR reaksiyonunda amplifiye edilir. Proseste prob, ileri ve geri primerler arasında bulunan spesifik bir hedef dizisine yeniden birleştirilir. PCR döngüsünün genişleme evresi esnasında *Taq* polimerazın 5' nükleaz aktivitesi probu bozundurarak haberci boyanın söndürücü boyadan ayrılmasına neden olur, böylelikle floresan bir sinyal oluşturur. Her döngüyle, ilave haberci boya molekülleri ilgili problemlerden ayrılarak floresan yoğunluğunu artırır. Floresan yoğunluğu, desteklenen gerçek zamanlı PCR cihazları (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast ya da Bio-Rad CFX96) tarafından her PCR döngüsünde izlenir.

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ile Kullanılacak Kontrol Materyalleri

- Analiz prosesinde, yanlış pozitif sonuçlara yol açabilecek kontaminasyon kontrolü yapılması için "şablonsuz" (negatif) bir kontrol gerekir ve PCR plakası başına en az bir kez kullanılmalıdır. Kullanıcı, ekstrakte edilmiş RNA yerine, şablonsuz kontrol olarak kullanılmak üzere su ekler.
- Hedeflenen SARS-CoV-2 RNA'yı tespit etme mekanizmasının bozulmadığından emin olmak için pozitif şablon kontrolü gerekir ve PCR plakası başına en az bir kez kullanılmalıdır (50 kopya/reaksiyon). Kitteki pozitif kontrol, viral hedef dizilerine karşılık gelen sentetik RNA'dır.
- Orijinal numunedeki RNA'nın ekstraksiyon esnasında iyi korunmasını sağlamak üzere bir ekstraksiyon kontrolü (İnsan Numune Kontrolü veya HSC) gerekir ve ekstraksiyon serisi başına en az bir kez kullanılmalıdır.
- Orijinal numuneden RNA'nın qRT-PCR reaksiyonunda tespit edilebilir olmasını sağlamak üzere bir dahili kontrol (İnsan RNaz P geni) gerekir. Yeterli hücresel RNA ile çoğu insan numunesinde ve HSC'de tespit edilmesi beklenir. İnsan numunelerinde, SARS-CoV-2 viral RNA'sı yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğunda dahili kontrol tespit edilmeyebilir.

Kitle birlikte temin edilen kontroller

Tablo 1 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ile birlikte temin edilen kontrol

Kontrol Tipi	Kontrol Adı	Tedarikçi Adı	Tedarikçi p/n
Pozitif	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

Gerekli olan ancak kitle birlikte temin edilmeyen kontroller

- “Şablonsuz” (negatif) kontrol olarak kullanılacak, moleküler sınıf, nükleaz içermeyen su
- Ekstraksiyon kontrolü: CDC tavsiyeleri temelinde müşteriye çeşitli seçenekler sunulur
 - CDC tarafından üretilen İnsan Numune Kontrolü, KT0189
 - Negatif insan numune materyali: Laboratuvarlar, ekstrakte etmek ve klinik örneklerin yanında bir ekstraksiyon kontrolü olarak çalıştırmak üzere bir insan numune materyali hacmi (ör. insan serumları veya birleştirilmiş kalan negatif solunum numuneleri) hazırlayabilir. Bu materyal, birden fazla çalıştırmada kullanılacak kadar yeterli hacimde hazırlanmalıdır. Ekstraksiyon kontrolü olarak kullanılmadan önce materyal, bu kullanma talimatlarında listelenen HSC için beklenen sonuçları oluşturduğundan emin olunması için test edilmelidir.
 - Yapay insan numunesi materyali: Laboratuvarlar, herhangi bir insan hücre dizisini (ör. A549, Hela ya da 293) PBS içinde süspanse ederek yapay insan numunesi materyalleri hazırlayabilir. Bu materyal, birden fazla çalıştırmada kullanılacak kadar yeterli hacimde hazırlanmalıdır. Ekstraksiyon kontrolü olarak kullanılmadan önce materyal, bu kullanma talimatlarında listelenen HSC için beklenen sonuçları oluşturduğundan emin olunması için test edilmelidir.

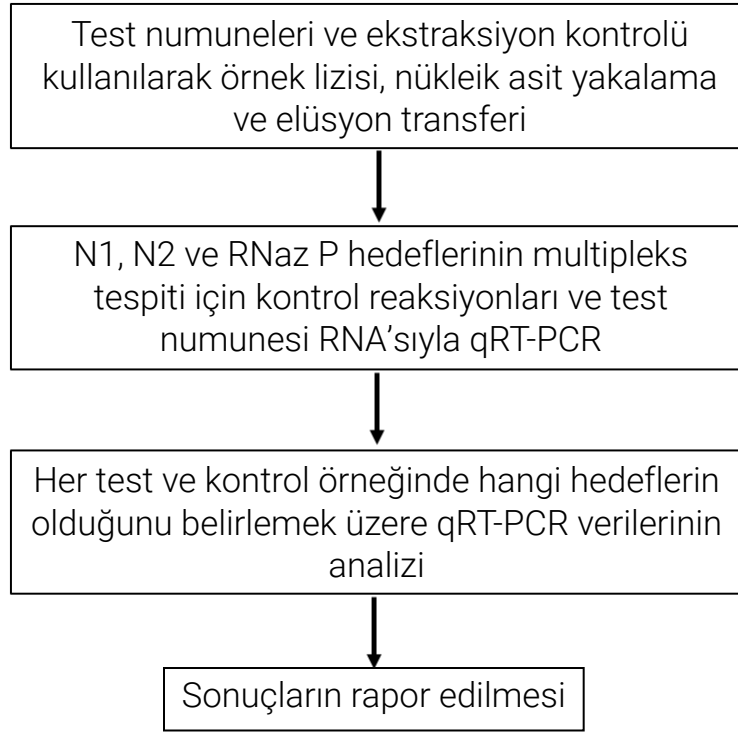
Analiz İş Akışı

Analize başlamak için, uygun bir İnsan Numune Kontrolünün yanında nazofaringeal test numunelerinden nükleik asit ekstrakte edin.

Ardından, ekstrakte edilmiş RNA numuneleri ve temin edilen pozitif RNA kontrolü kullanılarak multipleks qRT-PCR deneyi çalıştırın. Şablonsuz Kontrol (NTC) dahil edin.

qRT-PCR çalışması tamamlandığında, N1 ile N2 viral hedeflerinin ve insan RNaz P geni hedefinin amplifikasyonu için verileri analiz edin.

Son olarak, test numuneleri için sonuçları rapor edin.



Şekil 1 SARS-CoV2 qRT-PCR Dx Analizinin İş Akışı

2

Materyaller, Güvenlik ve Kullanım

Temin Edilen Materyaller **11**

Gerekli Olan Ancak Temin Edilmeyen Reaktifler, Materyaller, Ekipmanlar ve Yazılım **12**

Güvenlik Önemleri **15**

Saklama ve Kullanım **17**

Bu bölümde, analizde kullanılan reaktifler ve diğer materyaller açıklanmakta ve analizin güvenli biçimde gerçekleştirilmesine yönelik bilgiler sağlanmaktadır.

Temin Edilen Materyaller

Tablo 2'de, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ile birlikte temin edilen materyaller ve bunların sıcaklıkla ilgili gereklilikleri listelenmektedir. Materyallerin saklanmasıyla ilgili diğer talimatlar için bkz. **"Saklama ve Kullanım"**, sayfa 17.

Tablo 2 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, p/n K1180A ile birlikte temin edilen materyaller

Materyaller	Miktar	Bileşenler	Saklama Sıcaklığı
Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents, p/n K1180-64100*	400 qRT-PCR reaksiyon için yeterli (test numuneleri ve kontroller) <i>Her qRT-PCR reaksiyon plakasında, kontrol reaksiyonları için en az 3 kuyucuk olması gerektiğini unutmayın.</i>	2x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Aldığınızda -20°C'de saklayın.
		RT/RNase Block Dx	Aldığınızda -20°C'de saklayın.
		Reference Dye Dx [†]	Aldığınızda -20°C'de saklayın.
		100 mM DTT Dx	Aldığınızda -20°C'de saklayın.
		10x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx [‡]	Aldığınızda -20°C'de saklayın.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, p/n K1180-64200 [‡]	8 analiz testi için yeterlidir	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Aldığınızda -80°C'de saklayın.

* SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents kit, Agilent p/n K1180B gibi ayrı olarak da satışa sunulmaktadır.

[†] Bu reaktif ışığa duyarlıdır ve mümkün olduğunda ışıktan uzak tutulmalıdır.

[‡] SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx de Agilent p/n K1180C gibi ayrı olarak satışa sunulmaktadır.

Gerekli Olan Ancak Temin Edilmeyen Reaktifler, Materyaller, Ekipmanlar ve Yazılım

Tablo 3'te, protokolün, otomasyon için bir cihazda gerçekleştirilen RNA ekstraksiyon adımıyla ilişkin seçenekler listelenmektedir. RNA ekstraksiyon prosedürü "**Nükleik Asit Ekstraksiyonu için Talimatlar**", sayfa 18'de açıklanmaktadır.

Tablo 3 RNA ekstraksiyon seçenekleri – Gereklidir ancak temin edilmez

RNA Ekstraksiyon Kiti	Cihaz
QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, p/n 937055	QIAGEN QIAAsymphony SP, p/n 9001297 (otomasyon)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nükleik Asit İzolasyon Kiti, Thermo Fisher p/n A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Saflaştırma Sistemi, p/n 5400630 (otomasyon)

Tablo 4'te, İnsan Numune Kontrolü seçenekleri listelenmektedir. Bu kontrol örneği, nükleik asidin başarılı biçimde geri kazanıldığını ve ekstraksiyon reaktifinin bütünlüğünü ortaya koymak üzere ekstraksiyon prosedür kontrolü olarak kullanılan bir insan hücre kültürü preparatıdır.

Tablo 4 İnsan Numune Kontrolü seçenekleri – Gereklidir ancak temin edilmez

İnsan Numune Kontrolü	Açıklama
İnsan Numune Kontrolü (HSC), 10 flakon × 500 µl, CDC p/n KT0189	CDC tarafından üretilir ve satılır. CDC HSC, pH 7,2-7,4'de 0,01 M PBS içinde süspanse sıvı olarak temin edilen, enfeksiyöz olmayan (beta-Propiolakton ile işlenmiş), kültürlenmiş insan hücre materyalinden oluşur.
Negatif insan numune materyali	Laboratuvar tarafından hazırlanır. Bu tip İnsan Numune Kontrolü, ekstrakte edilmeye ve klinik numunelerin yanında bir ekstraksiyon kontrolü olarak çalıştırılmaya yönelik bir insan numune materyali hacmidir (ör. insan serumları veya birleştirilmiş artık negatif solunum numuneleri). Bu materyal, birden fazla çalıştırmada kullanılacak kadar yeterli hacimde hazırlanmalıdır. Ekstraksiyon kontrolü olarak kullanılmadan önce materyal, bu kullanma talimatlarında listelenen HSC için beklenen sonuçları oluşturduğundan emin olunması için test edilmelidir.
Yapay insan numunesi materyali	Laboratuvar tarafından hazırlanır. Bu tip İnsan Numune Kontrolü, herhangi bir insan hücre dizisi (ör. A549, Hela ya da 293) PBS içinde süspanse edilerek hazırlanan yapay insan numunesi materyalleridir. Bu materyal, birden fazla çalıştırmada kullanılacak kadar yeterli hacimde hazırlanmalıdır. Malzeme, bu Kullanma Talimatlarında listelenen İnsan Numune Kontrolü için beklenen sonuçları ürettiğinden emin olmak için ekstraksiyon kontrolü olarak kullanılmadan önce test edilmelidir.

Tablo 5 ile **Tablo 6** arasında, gerekli olan ancak Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ile birlikte temin edilmeyen ilave reaktifler, materyaller, ekipmanlar ve cihazlar listelenmektedir.

Tablo 5 Gerekli olan ancak temin edilmeyen reaktifler ve materyaller

Reaktif veya materyal	Biçim
Moleküler sınıf, nükleaz içermeyen su	Reaktif
%10 çamaşır suyu çözeltisi (%5,25-6 hipokloritli çamaşır suyunun 1:10 seyreltisi)	Materyal
DNAZap, Ambion p/n AM9890 veya eşdeğer dekontaminasyon maddesi	Materyal
RNase AWAY, Fisher Scientific p/n 21-236-21 veya eşdeğer dekontaminasyon maddesi	Materyal
Tek kullanımlık pudrasız eldivenler ve cerrahi önlükler	Materyal
Steril, nükleaz içermeyen, aerosol bariyerli pipet uçları	Materyal
Nükleaz içermeyen 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri	Materyal
Nükleaz içermeyen 2 ml mikrosantrifüj tüpleri	Materyal
Nükleaz içermeyen 96 kuyucuklu plakalar, 200 µl	Materyal
<i>Seçilen gerçek zamanlı PCR sistemiyle uyumlu plakalar kullanın</i>	
Nükleaz içermeyen 8x tüp stripi	Materyal
96 kuyucuklu PCR plakaları için Nükleaz içermeyen yapışkanlı plaka sızdırmazlıkları ya da	Materyal
Nükleaz içermeyen 8x optik kapak stripi	
<i>Seçilen gerçek zamanlı PCR sistemiyle uyumlu sızdırmazlıklar ya da stripler kullanın</i>	
MicroAmp Optical Film Sıkıştırma Pedleri, Thermo Fisher Scientific, p/n 4312639*	Materyal

* Sıkıştırma pedleri yalnızca, AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR sisteminde plakaların sızdırmazlığının sağlanması için yapışkan sızdırmazlıklar kullanılırken gereklidir

Tablo 6 Gerekli olan ancak temin edilmeyen cihazlar, yazılım ve ekipmanlar

Cihaz, yazılım veya ekipman	Biçim
Gerçek zamanlı PCR sistemi	Bilgisayar ve yazılımla birlikte cihaz
Agilent AriaMx Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (p/n G8830A) ya da AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (p/n K8930AA)	
Yazılım: Aria yazılım sürümü 1.71 ve 1.8 Elektronik İzleme Yazılımı (p/n K8930AA ile birlikte verilir ya da p/n G5380AA koduyla ayrı olarak sunulur)	
ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazı, dizüstü bilgisayarla (p/n 4351106) veya masaüstü bilgisayarla (p/n 4351107)	
Yazılım: 7500 Yazılım sürümü 2.3 ile Design & Analysis Yazılımı sürüm 2.4.3	
Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi (p/n 1855195) veya Başlangıç Paketiyle CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi (p/n 1855196)	
Yazılım: CFX Maestro Yazılımı 2.0 sürüm 4.1.2 (p/n 1855196 ile birlikte verilir veya p/n 12004110 koduyla ayrı olarak sunulur)	
Gerçek zamanlı PCR yazılımından dışa aktarılan verileri görüntüleme yazılımı, ör. Microsoft Excel	Yazılım
Vorteks karıştırıcı	Ekipman
Mikrosantrifüj	Ekipman
96 kuyucuklu plakalar için plaka santrifüjü	Ekipman
P10, P20, P200 ve P1000 mikro pipetörler	Ekipman

Tablo 6 Gerekli olan ancak temin edilmeyen cihazlar, yazılım ve ekipmanlar (continued)

Cihaz, yazılım veya ekipman	Biçim
Çok kanallı pipetörler (5-50 µl)	Ekipman
Mikrosantrifüj tüpleri için raklar	Ekipman
İki adet (2) 96 kuyucuklu soğuk rak	Ekipman
Buz kovası	Ekipman

Güvenlik Önemleri

- 1 Hatalı sonuç riskinden kaçınılması için Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit iş akışı vasıflı ve eğitilmiş personel tarafından gerçekleştirilmelidir. Yanlış pozitif sonuçlar oluşmasını önlemek amacıyla hasta örneklerini ve kontrollerini hazırlamak için ayrı alanlar kullanın.
- 2 Bu test yalnızca SARS-CoV-2'den nükleik asidin tespit edilmesi için onaylanmıştır, başka bir virüs veya patojen için değildir.
- 3 Kullanma Talimatlarının tamamını dikkatlice okuyun.
- 4 Örnekler ve kontrollere daima güvenli laboratuvar prosedürlerine uygun şekilde enfeksiyöz ve/veya biyozararlı madde olarak muamele edilmelidir. 2019-nCoV ile ilişkili Numunelerin Kullanılmasına ve İşlenmesine Yönelik Ara Laboratuvar Biyogüvenlik Kılavuzlarına bakın. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- 5 Numuneleri kullanırken gerekli önlemlere uyun. Potansiyel enfeksiyöz örneklerin kullanımına ilişkin güncel kılavuzlarla tutarlı şekilde kişisel koruyucu ekipmanlar (KKE) kullanın. Dökülme meydana gelirse, hemen dezenfekte edin.
- 6 Numuneler enfeksiyöz olabilir. Bu analizi gerçekleştirirken Evrensel Önlemleri uygulayın. Kullanım ve elden çıkarmayla ilgili doğru yöntemler, laboratuvar direktörü tarafından belirlenmelidir. Yalnızca enfeksiyöz materyallerin kullanımıyla ilgili uygun eğitimi almış personelin bu tanı prosedürünü gerçekleştirmesine izin verilmelidir.
- 7 Kamu sağlığı yetkilileri tarafından önerilen güncel klinik tarama kriterleri temelinde 2019-nCoV enfeksiyonu şüphesi varsa, numuneler uygun enfeksiyon kontrol önlemleri uygulanarak alınmalıdır.
- 8 Yalnızca temin edilen veya belirtilen tek kullanımlık laboratuvar gereçlerini kullanın.
- 9 Daima aerosol bariyerleri olan pipet uçları kullanın. Kullanılmış uçlar steril olmalı ve DNaz ile RNaz içermemelidir.
- 10 PCR bazlı analizler, önceki PCR reaksiyonlarından amplifikasyon ürünlerinin yanlışlıkla girmesi durumlarına yatkındır. Test örneklerinin veya reaktiflerin kontamine olması halinde hatalı bir sonuç oluşabilir. Laboratuvardaki iş akışı tek yönlü bir şekilde ilerletilmelidir. İş akışı boyunca örneklerin PCR ürünüyle kontamine olmasını önlemek için aşağıdaki en iyi uygulamaları kullanın:
 - Ayrı PCR öncesi ve PCR sonrası iş istasyonları belirleyin ve her alanda özel malzemeler ile reaktifler kullanın. Özellikle, PCR sonrası çalışmaya atanmış materyalleri iş akışının PCR öncesi segmentleri için asla kullanmayın. Özel PCR öncesi çözeltileri pipetlemek için daima nükleaz içermeyen, aerosole dayanıklı uçları olan özel PCR öncesi pipetörler kullanın.
 - Çalışma alanlarını temiz tutun. PCR öncesi yüzeyleri günde bir kez ve her analiz arasında, %10 çamaşır suyu çözeltisi ve/veya DNazap ya da RNase AWAY gibi bir ürünle temizleyin. Kalan çamaşır suyunu %70 etanol ile giderin.
 - Temiz bir laboratuvar önlüğü ve temiz, pudrasız eldivenler giyin. Kontamine olmuş olabilecek yüzeylerle temas ettikten sonra eldiven değiştirmeyi de içerecek şekilde iyi laboratuvar hijyeni uygulayın.
 - Tüm manuel sıvı aktarımları arasında aerosol bariyerli pipet uçlarını değiştirin.
 - Örneklerden nükleik asit ekstrakte ederken, örnekler arasında çapraz kontaminasyon oluşması riskini en düşük düzeye indirmek için doğru aseptik tekniği kullanın ve örnekler yanlışlıkla nükleazlar girmesini önleyin.
 - Mümkün olduğunda, reaktif ve reaksiyon tüplerini kapaklı ya da kapalı tutun.

- 11 Çalışma alanlarının içinde bir şey yemeyin, içmeyin, tütün mamulü kullanmayın ya da makyaj malzemeleri uygulamayın.
- 12 Analiz reaktifleri, analiz protokolü veya enstrümantasyonda değişikliklere izin verilmemektedir.
- 13 Reaktifler, **Tablo 2**, sayfa 11 ve **“Saklama ve Kullanım”**, sayfa 17 içerisinde belirtildiği gibi saklanmalı ve kullanılmalıdır.
- 14 Belirtilen son kullanma tarihinden sonra kiti kullanmayın.
- 15 Atığı, yerel düzenlemelere ve devlet düzenlemelerine uygun şekilde elden çıkarın.
- 16 Güvenlik Veri Belgeleri www.agilent.com adresinde bulunabilir.
- 17 Gerçek zamanlı PCR cihazında, Guanidinyum tiyosiyanat içerebilecek materyal veya guanidin içeren materyaller kullanmayın. Sodyum hipokloritle (çamaşır suyu) birleştirilirse yüksek düzeyde reaktif ve/veya toksik bileşikler oluşabilir.
- 18 Pozitif sonuçlar, SARS-CoV-2 RNA'sının varlığını işaret eder.

Saklama ve Kullanım

Ürün ambalajı

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürününü aldığınızda, ürünün kutusunda görünür hasar olup olmadığını dikkatlice inceleyin. Ürünün kutusunda hasar olduğu saptanırsa, Agilent Teknik Destek birimiyle irtibat kurun.

Reaktiflerin saklanması, kullanılması ve stabilitesi

- Kullanmadan önce daima son kullanma tarihini kontrol edin. Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri kullanmayın.
- Florojenik problemleri ışıktan koruyun.
- Primerler, problemler (alıklar dahil) ve enzim ana karışımı çözündürülmeli ve hazırlık ve kullanım esnasında her zaman buz ya da soğuk rak üzerinde tutulmalıdır.
- Kontroller çözündürülmeli ve hazırlık ve kullanım esnasında her zaman buz ya da soğuk rak üzerinde tutulmalıdır.
- Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit reaktiflerinin saklama sıcaklıkları için bkz. **Tablo 2**, sayfa 11.

Numunelerin alınması, kullanılması ve saklanması

Numunelerin uygun olmayan şekilde veya yanlış alınması, saklanması ve taşınması halinde yanlış test sonuçları oluşması muhtemeldir. Numune kalitesinin önemi nedeniyle, numune alımıyla ilgili eğitim verilmesi önemle tavsiye edilir. Uygun bir kaynak olarak CLSI MM13-A'ya bakılabilir.

- Numunenin Alınması
 - 2019 Yeni Koronavirüs (2019-nCoV) için Tetkik Edilmekte Olan Hastalardan Klinik Numunelerin Alınması, Kullanılması ve Test Edilmesine Yönelik Ara Kılavuzlara bakın: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
 - Doğru alım yöntemleri için, numune alım cihazı üreticisinin talimatlarına uyun.
- Numunelerin Taşınması
 - Hastadan alınan klinik materyal uygun bir taşıma sistemine yerleştirilmelidir. Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit için bu, viral taşıma ortamı (VTM), evrensel taşıma ortamı (UTM), salin, Sıvı Amies veya numune taşıma ortamında (STM) NP numunelerini içerir.

3

Nükleik Asit Ekstraksiyonu için Talimatlar

Nükleik Asit Ekstraksiyonu 19

Bu bölümde, klinik test örneklerinden ve İnsan Numune Kontrolünden RNA'nın ekstrakte edilmesine yönelik talimatlar yer almaktadır.

Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit performansı, insan numunelerinden arındırılan şablon RNA'nın miktarına ve kalitesine bağlıdır. Piyasada bulunan aşağıdaki RNA ekstraksiyon kitleri ve prosedürleri, kitle kullanılacak RNA'nın geri kazanılması ve saflığı için onaylanmış ve doğrulanmıştır.

Örnek ekstraksiyonu için, üreticinin önerdiği prosedürler (aşağıdaki tavsiyelerde belirtilenler dışında) izlenmelidir. Her bir ekstraksiyon serisine İnsan Numune Kontrolü dahil edilmelidir.

QIAGEN QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, otomasyon protokolü

Tavsiye: 140 µl örnek kullanın ve 60 µl tamponla elüe edin.

MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, otomasyon protokolü

Tavsiye: 200 µl örnek kullanın ve 50 µl tamponla elüe edin.

4

qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama Talimatları

Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR Deneyini Ayarlama **21**

qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama **41**

Bu bölümde, test örnekleri ve kontrol örnekleri için kantitatif ters transkripsiyon PCR (qRT-PCR) reaksiyonlarının hazırlanmasına yönelik talimatlar yer almaktadır.

Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR Deneyini Ayarlama

qRT-PCR reaksiyon plakasını ayarlamadan önce, reaksiyon plakası hazırlanır hazırlanmaz cihazın çalışmaya hazır olması için gerçek zamanlı PCR sisteminde deneyi ayarlayın.

Spesifik gerçek zamanlı PCR sisteminizin talimatlarını izleyin.

Agilent AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sistemi

- Gerekli ayarların olduğu bir şablon dosyanız yoksa bkz. **“AriaMx/AriaDx deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)”**, sayfa 21.
- Kullanılacak bir şablon dosyanız varsa bkz. **“AriaMx/AriaDx deneyini kayıtlı şablondan oluşturma”**, sayfa 27.

NOT

Kullanmadan en az 3 saat önce AriaMx ya da AriaDx cihazını açın. Kullanıma her zaman hazır olmasını sağlamak üzere cihaz daima açık bırakılabilir.

Cihaz spesifikasyonlarına göre, çalışma koşulları 20-30°C, %20-80 nem, ve ≤ 2000 metre rakımdır.

ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazı

- Gerekli ayarların olduğu bir şablon dosyanız yoksa bkz. **“ABI 7500 Fast deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)”**, sayfa 27.
- Kullanılacak bir şablon dosyanız varsa bkz. **“ABI 7500 Fast deneyini kayıtlı şablondan oluşturma”**, sayfa 33.

Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi

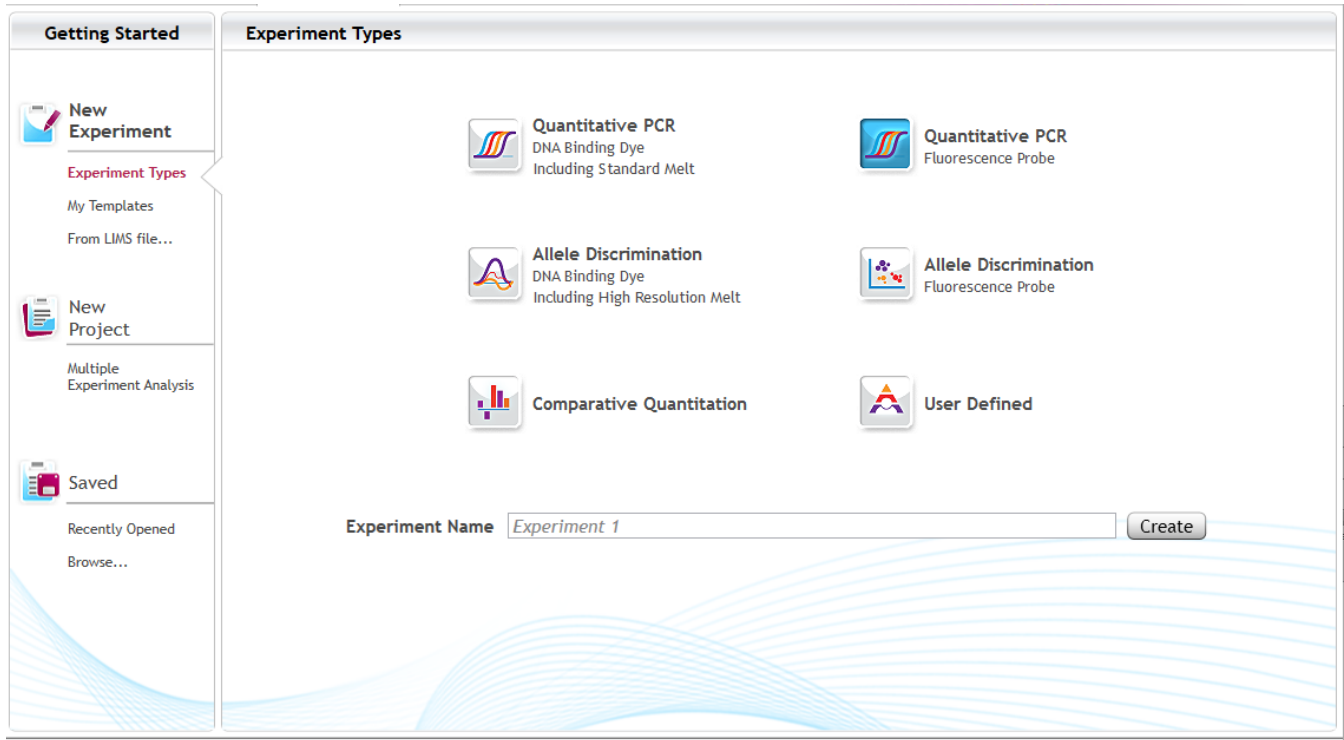
- Gerekli ayarların olduğu kayıtlı protokol ve plaka dosyalarınız yoksa bkz. **“Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma ve ayarlama (kayıtlı protokol ve plaka dosyaları henüz oluşturulmamışsa gereklidir)”**, sayfa 33.
- Kayıtlı protokol ve plaka dosyalarınız varsa bkz. **“Kayıtlı protokol ve plaka dosyalarından Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma”**, sayfa 39.

AriaMx/AriaDx deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)

Deney için bir şablon zaten varsa, **“AriaMx/AriaDx deneyini kayıtlı şablondan oluşturma”**, sayfa 27 kısmına gidin.

Adım 1. Deneyi oluşturma

- 1 Cihaza bağlı bilgisayardan, Aria yazılım uygulamasını açarak Getting Started ekranına gelin.
- 2 **New Experiment** altında **Experiment Types** ögesine tıklayın (zaten seçili değilse).
- 3 Ekranın ortasında, **Şekil 2’de** gösterildiği gibi **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** ögesini seçin.



Şekil 2 Aria Getting Started ekranı — **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** seçili

- 4 Experiment Name alanına deney için bir ad yazın ve **Create** ögesine tıklayın.

Yeni deney, Plate Setup ekranında açılır. Plaka haritasında tüm kuyucuklar varsayılan olarak seçilidir.

Plakanın tüm kuyucuklarında bir qRT-PCR reaksiyonu olacaksa 96 kuyucuğun tamamının seçilmesi uygundur. Plaka kuyucuklarından herhangi biri boş olacaksa, bu adımda o kuyucukların seçimini kaldırın.

Adım 2. Kuyucuk tiplerini ve kuyucuk adlarını atama

- 5 Ekranın sağ tarafındaki Properties panelinde, **Well type** açılır listesini genişletin ve **Unknown** ögesini seçin.

Plaka haritasında tüm kuyucuklar Unknown şeklinde işaretlidir.

- 6 Kuyucuk A12'yi No Template Control (NTC) olarak atayın.

a Plaka haritasında kuyucuk A12'ye tıklayarak o kuyucuğu seçin.

b Ekranın sağ tarafındaki Properties panelinde, **Well type** açılır listesini genişletin ve **NTC** ögesini seçin.

Plaka haritasında kuyucuk A12 NTC olarak işaretlenirken, diğer tüm kuyucuklar Unknown kuyucuk türüne atanmış halde kalır.

- 7 Plaka haritasında, tüm kuyucukları tekrar seçin.

Plaka haritasının sol üst köşesindeki onay kutusuna tıklandığında tüm kuyucuklar seçilir.

Şimdi plaka ayarı, **Şekil 3**'te sunulduğu gibi görünür.

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

Şekil 3 Aria Plate Setup ekranındaki kuyucuk türü atamaları

8 Kuyucuk adlarını kontrol kuyucuklarına ve isterseniz, test örnekleri için kullanılan kuyucuklara atayın. Kontrol kuyucuklarına atanacak kuyucuk adları **Tablo 7**'de sunulmaktadır. Manuel olarak ya da atanacak kuyucuk adlarının yanında kuyucuk kimliklerinin listelendiği, virgülle ayrılan metin dosyasını ya da bir Excel elektronik tablosunu içe aktararak kuyucuk adları atayabilirsiniz.

- Kuyucuk adlarını manuel olarak atamak için, **Type** kısmında Show ayarını **Name** şeklinde değiştirin. Plakadaki kuyucukları seçin, ardından seçili kuyucukların adını Well Name alanına yazın.
- Bir Excel ya da metin dosyasından kuyucuk adları atamak için, plaka haritasına sağ tıklayın ve **Import Well Name** öğesini seçin. Açılan iletişim kutusunda, Excel veya metin dosyasını seçin. Dosya biçimlendirmesiyle ilgili gereklilikler için Aria yardım sistemine bakın.

Tablo 7 Kontrol kuyucukları için kuyucuk adı atamaları

Kuyucuk Kimliği	Kuyucuk adı
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

* Plakaya dahil edilmesi gereken birden fazla İnsan Numunesi Kontrol örneğiniz varsa, bu reaksiyonlar için sütun 12'deki ilave kuyucukları kullanın ve kuyucukları uygun şekilde adlandırın (ör. HSC1, HSC2 vb.).

Adım 3. Boyalar ve hedefler atama

- 9 Properties panelinde, **Add Dyes** kısmının altında, FAM, HEX ve Cy5 onay kutularını işaretleyin.
İşaretlenen boyaların her biri için renk kodlu noktalar, plaka haritasının tüm kuyucuklarında görünür.
- 10 Reference Dye açılır listesinde **ROX** öğesini seçin.
Plaka haritasında tüm kuyucuklarda "R" etiketli, renk kodlu bir nokta görünür.
- 11 **Targets** öğesinin yanındaki oka tıklayın.
- 12 Görünen Target Name alanlarında, **Şekil 4'e** uygun şekilde hedef adlarını yazın.

The screenshot shows the 'Add Dyes' and 'Targets' panels. The 'Add Dyes' panel has a table with columns 'Use', 'Dye Name', and 'Target Name'. The 'Targets' panel has a table with columns 'Target Name' and a color-coded circle. The 'Reference Dye' is set to 'ROX'.

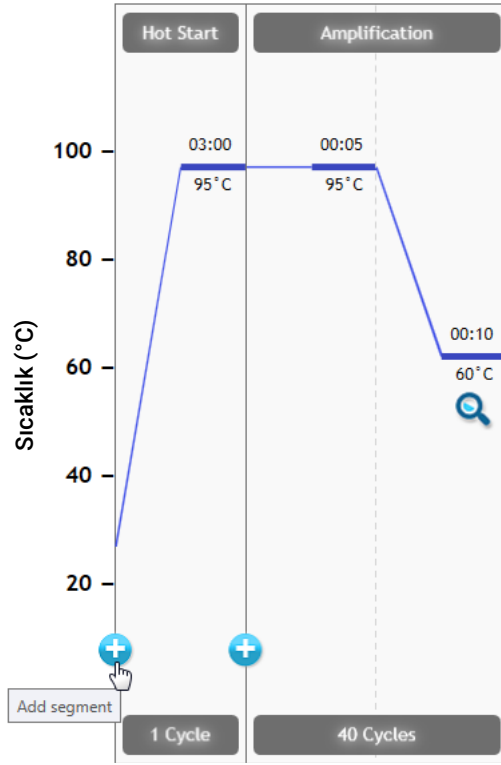
Use	Dye Name	Target Name
☒	FAM	N1
☒	ROX	
☒	HEX	N2
☒	CY5	RP
☐	CY3	
☐	ATTO425	

Reference Dye: ROX

Şekil 4 Aria Plate Setup ekranındaki boya ve hedef atamaları

Adım 4. Termal profili ayarlama

- 13 Ekranın sol tarafında, **Set Up** kısmının altında **Thermal Profile** öğesine tıklayın.
Thermal Profile ekranı açılarak varsayılan termal profili gösterir.
- 14 Döngü programının başlangıcına bir RT segmenti ekleyin.
 - a Ekranda, imleci Hot Start segmenti üzerine getirin. Hot Start segmentinin sol tarafında görünen + simgesine tıklayın (**Şekil 5'te** sunulduğu gibi).

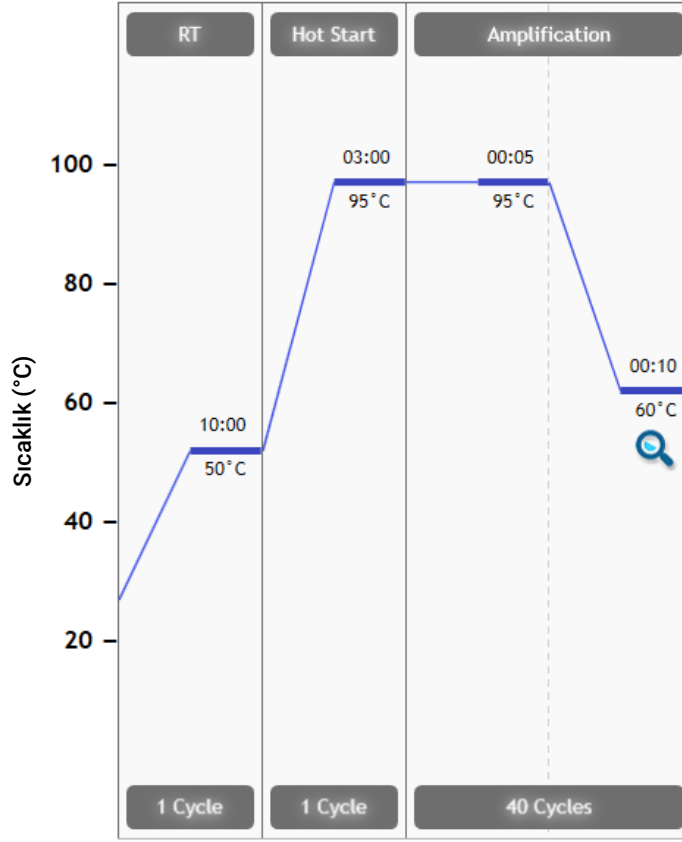


Şekil 5 Aria Thermal Profile ekranına yeni segment ekleme

Program yeni segment için mevcut segment türlerinin listelendiği bir yer işareti açar.

b Yer işareti segmentinde **RT** ögesine tıklayın.

Şimdi termal profil, **Şekil 6**'da sunulduğu gibi görünür.



Şekil 6 Aria Thermal Profile ekranındaki termal profil

15 Ekranınızdaki termal profilin, **Tablo 8**'de sunulan termal döngü programıyla eşleştiğinden emin olun.

Tablo 8 AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sistemi için termal döngü programı

Segment Numarası	Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
1	1	10 dakika	50°C
2	1	3 dakika	95°C
3	40	5 saniye	95°C
		10 saniye	60°C

Adım 5. Deneyi şablon olarak kaydetme

16 File > Save As Template öğelerine tıklayın.

Save As iletişim kutusu açılır. Dosya türü, **AriaMx Template Files** (dosya uzantısı *amxt*) ya da **AriaDx Template Files** (dosya uzantısı *adxt*) olarak ayarlanır.

17 Yeni şablon için bir klasör seçin.

18 File name alanına **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** yazın.

19 Save öğesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve program yeni şablon dosyasını belirlenmiş klasöre kaydeder.

Gelecekteki analizler için, qRT-PCR deneyini “**AriaMx/AriaDx deneyini kayıtlı şablondan oluşturma**” kısmında açıklandığı gibi oluşturmak ve ayarlamak amacıyla kayıtlı şablonu kullanın.

Bu noktada doğrudan “**qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama**”, sayfa 41 kısmına gidin.

AriaMx/AriaDx deneyini kayıtlı şablondan oluşturma

Gerekli plaka ayarı ve termal profilin olduğu bir deney şablonu oluşturulmamışsa, bkz. “**AriaMx/AriaDx deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)**”, sayfa 21.

- 1 Cihaza bağlı bilgisayardan, Aria yazılım uygulamasını açarak Getting Started ekranına gelin.
- 2 **New Experiment** altında **My Templates** ögesine tıklayın.
- 3 Experiment Name alanına yeni deney için bir ad yazın.
- 4 **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** şablonunu seçin ve deneyi oluşturun.
 - Şablon varsayılan klasördeyse, doğrudan şablona tıklayarak şablonu seçin ve ardından **Create** ögesine tıklayın (ya da doğrudan şablona çift tıklayın). Program yeni deneyi oluşturur ve deneyi Plate Setup ekranında açar.
 - Şablon mevcut durumda seçili klasörde değilse, tarayıcı penceresini açmak için **Browse to Template** simgesine (aşağıda gösterilmektedir) tıklayın. **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** şablon dosyasının olduğu klasöre gözetin. Dosyayı seçin ve **Open** ögesine tıklayın. Program yeni deneyi oluşturur ve deneyi Plate Setup ekranında açar.



Bu noktada doğrudan “**qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama**”, sayfa 41 kısmına gidin.

ABI 7500 Fast deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)

Deney için bir şablon zaten varsa, “**ABI 7500 Fast deneyini kayıtlı şablondan oluşturma**”, sayfa 33 kısmına gidin.

Adım 1. Deneyi oluşturma

- 1 ABI 7500 Fast cihazını açın.
- 2 Cihaza bağlı bilgisayardan, 7500 Sistemi Yazılım uygulamasını açın.
- 3 Home ekranında **Set Up** altında, **Advanced Setup** ögesine tıklayın.

Experiment ekranı açılır.
- 4 Ekranın sol tarafındaki **Experiment Menu** içerisinde, **Setup** altında **Experiment Properties** ögesine tıklayın (zaten seçili değilse).

Deney Özelliklerinin ayarları ekranın orta kısmında gösterilir.
- 5 **Tablo 9**'da sunulan seçimleri ve girişleri kullanarak ekrandaki soruları yanıtlayın.

Tablo 9 Deney Özellikleri ayarları

Soru	Seçimler/giriřler
How do you want to identify this experiment? (Bu deneyi nasıl tanımlamak istiyorsunuz?)	- Experiment Name: Deney için benzersiz bir ad yazın - Barcode: Boş bırakın - User Name: Adınızı yazın - Comments: İstedığınız yorumlar varsa yazın veya boş bırakın
Which instrument are you using to run the experiment? (Deneyi alıştırmak için hangi cihazı kullanıyorsunuz?)	7500 Fast (96 Kuyucuk)
What type of experiment do you want to set up? (Hangi deney türünü ayarlamak istiyorsunuz?)	Miktar Tayini – Standart Eğri
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (Hedef diziyi tespit etmek için hangi reaktifleri kullanmak istiyorsunuz?)	TaqMan® Reaktifleri
Which ramp speed do you want to use in the instrument run? (Cihazın çalışmasında hangi rampa hızını kullanmak istiyorsunuz?)	Hızlı

Adım 2. Hedefleri ve örnekleri tanımlama

- 6 Ekranın sol tarafındaki **Experiment Menu** içerisinde, **Setup** altında **Plate Setup** öğesine tıklayın. Üst kısımda **Define Targets and Samples** sekmesinin seçili olduğundan emin olun.

Hedeflerin ve örneklerin tanımlanmasına yönelik araçlar ekranın orta kısmında gösterilir.

- 7 Define Targets tablosunda, **Şekil 7**'de sunulduğu gibi N1, N2 ve RP için hedefler oluşturun. Tabloya gerektiği şekilde bir satır eklemek için **Add New Target** öğesine tıklayın.

Quencher seçiminde, tüm hedefler için **NFQ-MGB** öğesini seçin. **Color** seçimi için, varsayılanı kullanın ya da istediğiniz rengi seçin.

Define Targets			
Add New Target	Add Saved Target	Save Target	Delete Target
Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	
N2	VIC	NFQ-MGB	
RP	CY5	NFQ-MGB	

Şekil 7 7500 Yazılımı Plaka Ayarı ekranındaki hedef tanımları

- 8 Define Samples tablosunda, **Şekil 8**'de sunulduğu gibi örnek adları oluşturun. Tabloya gerektiği şekilde bir satır eklemek için **Add New Sample** öğesine tıklayın.

Üç örnek, İnsan Numune Kontrolü (**HSC**), Şablonsuz Kontrol (**NTC**) ve SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrollü pozitif kontroldür (**Pos**). Test örneklerine bir örnek adı atanmadığına dikkat edin.

Color seçimi için, varsayılanı kullanın ya da istediğiniz rengi seçin.

Define Samples

Add New Sample Add Saved Sample Save Sample Delete Sample

Sample Name	Color
HSC	
NTC	
Pos	

Şekil 8 7500 Yazılımı Plaka Ayarı ekranındaki örnek tanımları

Adım 3. Hedefler ve görevler atama

- 9 Ekranın üst kısmında, **Assign Targets and Samples** sekmesine tıklayın. **View Plate Layout** sekmesinin seçili olduğundan emin olun.

Ekranı, 96 kuyucuklu plakanın bir plaka haritası gösterilir.

- 10 Plaka haritasında, 96 kuyucuğun hepsini seçin.

Seçili kuyucuklar mavi renkli olarak vurgulanıp, ortalarında beyaz renkli bir oval şekil olur.

Plakanın tüm kuyucuklarında bir qRT-PCR reaksiyonu olacaksa 96 kuyucuğun tamamının seçilmesi uygundur. Plaka kuyucuklarından herhangi biri boş olacaksa, bu adımda o kuyucukları seçmeyin.

- 11 **Assign target(s) to the selected wells** altındaki tabloda, tüm kuyucuklarda üç hedefin de izleneceğini ve rapor edileceğini göstermek üzere Assign sütunundaki üç onay kutusunu da işaretleyin. Task sütununda, üç hedef için de "U" ögesinin seçili olduğundan emin olun. Bkz. **Şekil 9**.

Plaka haritasında, 96 kuyucuğun hepsinde her hedef için bir simge gösterilir.

Assign target(s) to the selected wells.

Assign	Target	Task	Quantity
☒	N1	  	
☒	N2	  	
☒	RP	  	

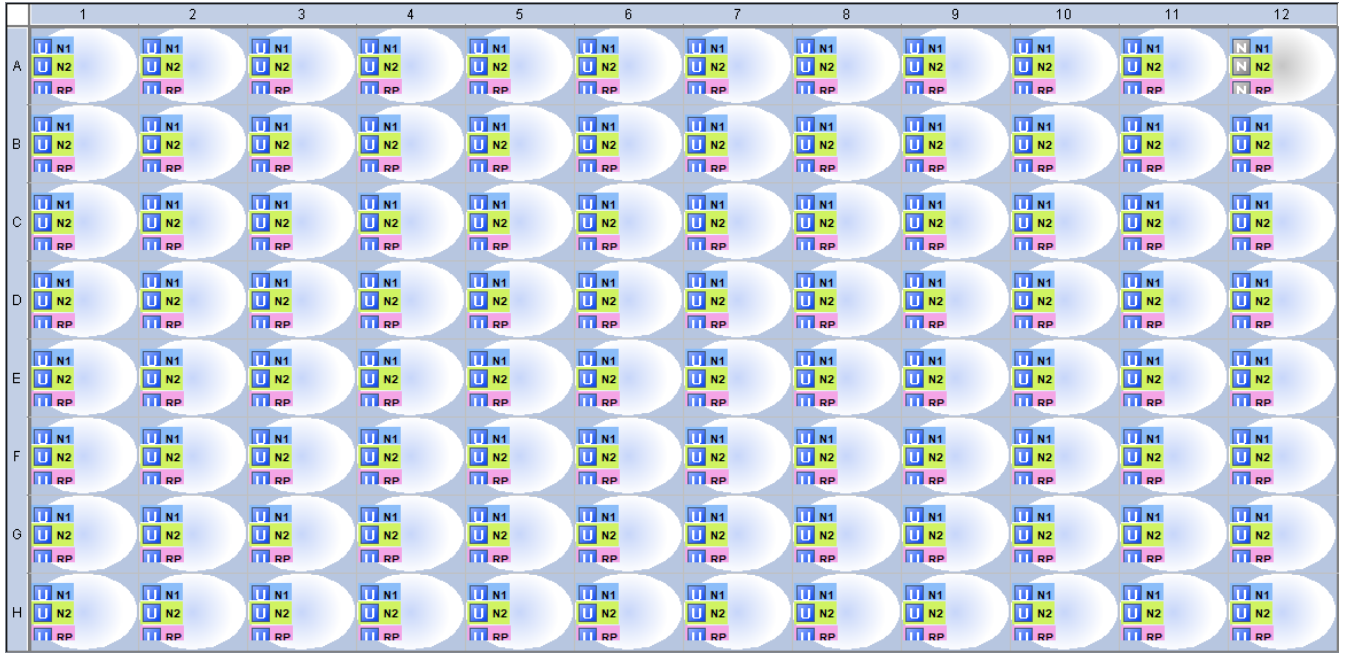
Şekil 9 7500 Yazılım Görünümü Plaka Düzeni sekmesindeki hedef atamaları

- 12 Şablonsuz Kontrol kuyucuğu için atanmış görevi değiştirin.

a Plaka haritasında kuyucuk A12'yi seçin.

b **Assign target(s) to the selected wells** kısmının altındaki tabloda, üç hedef için de Task sütunundaki seçimi "N" olarak değiştirin. Assign sütunundaki onay kutularının işaretli kaldığından emin olun.

Şimdi plaka haritası **Şekil 10**'da sunulduğu gibi görünür.



Şekil 10 7500 Sistemi Plaka Ayarı ekranındaki plaka haritası

Adım 4. Kontrol örnekleri atama

13 Kuyucuk A12'ye Şablonsuz Kontrolü atayın.

- Plaka haritasında kuyucuk A12'yi seçin.
- Assign sample(s) to the selected wells** altındaki tabloda **NTC** ögesini işaretleyin.

Örnek adı NTC seçili kuyucukta gösterilir.

14 Kuyucuk B12'ye İnsan Numune Kontrolü örneğini atayın.

- Plaka haritasında kuyucuk B12'yi seçin.
Plakaya dahil edilmesi gereken birden fazla İnsan Numune Kontrolü örneğiniz varsa, plaka haritasında sütun 12'de gerekli ek kuyucuk sayısını seçin.
- Assign sample(s) to the selected wells** altındaki tabloda **HSC** ögesini işaretleyin.

Örnek adı HSC seçili kuyucuklarda gösterilir.

15 SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolü örneğini kuyucuk H12'ye atayın.

- Plaka haritasında kuyucuk H12'yi seçin.
- Assign sample(s) to the selected wells** altındaki tabloda **Pos** ögesini işaretleyin.

Örnek adı Pos seçili kuyucukta gösterilir.

Adım 5. Referans boyayı atama

16 **Select the dye to use as the passive reference** ögesinin altındaki tabloda **ROX** ögesini seçin.

Adım 6. Çalışma yöntemini ayarlama

17 Ekranın sol tarafındaki **Experiment Menu** içerisinde, **Setup** altında **Run Method** öğesine tıklayın. Üst kısımdaki **Tabular View** sekmesine tıklayın.

Reaksiyon hacminin ve termal profilin tanımlanmasına yönelik araçlar ekranın orta kısmında gösterilir.

18 **Reaction Volume Per Well** alanının 20 µl olarak ayarlandığından emin olun. Ayarlanmamışsa, alana **20** yazın.

19 Termal profili **Şekil 11**'de sunulanla eşleştirecek şekilde ayarlayın. Ayarlar **Tablo 10**'da da özetlenmektedir.

50°C ters transkripsiyon adımı için termal profilin başlangıcına yeni bir bekletme evresi eklemeniz gerekiyorsa aşağıdaki adımları uygulayın.

a Termal profil görüntüsünde en soldaki evreyi seçin.

b **Add Stage > Holding** öğelerine tıklayın.

Termal profilin başlangıcına yeni bir bekletme evresi eklenir. Sıcaklığı ve süreyi **Şekil 11**'de sunulanlarla eşleştirecek şekilde ayarlayın.

	Holding Stage	Holding Stage	Cycling Stage	
			Number of Cycles: 40 ☐ Enable AutoDelta Starting Cycle: 2	
Ramp Rate (%):	100.0	100.0	100.0	100.0
Temperature (°C):	50.0	95.0	95.0	60.0
Time:	10:00	03:00	00:05	00:30
AutoDelta Temp:				
AutoDelta Time:				
Collect Data on Ramp:				
Collect Data on Hold:				
	Step 1	Step 1	Step 1	Step 2

Şekil 11 7500 Yazılımı Çalışma Yöntemi ekranında termal profil

Tablo 10 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazı için termal profil ayarları

Segment Numarası	Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
1	1	10 dakika	50°C
2	1	3 dakika	95°C
3	40	5 saniye	95°C
		30 saniye	60°C

Adım 7. Deneyi kaydetme

20 Ekranın üst kısmında, Save seçenekleri menüsünü genişletmek üzere **Save** düğmesinin yanındaki aşağı oka tıklayın.

21 Menüde **Save As** öğesini seçin.

Save As iletişim kutusu açılır.

22 Yeni deney dosyası için bir klasör seçin.

23 File name alanına deney için bir ad yazın.

24 Dosya türünün **Experiment Document Single files (*.eds)** olarak ayarlandığından emin olun.

25 **Save** öğesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve program deney dosyasını belirlenmiş klasöre kaydeder.

Adım 8. Deneyi gelecekte kullanmak üzere bir şablon olarak kaydetme

26 Save seçenekleri menüsünü genişletmek üzere **Save** düğmesinin yanındaki aşağı oka tıklayın.

27 Menüde **Save As Template** öğesini seçin.

Save As Template iletişim kutusu açılır.

28 Yeni şablon için bir klasör seçin.

29 File name alanına **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** yazın.

30 Dosya türünün **Experiment Document Template files (*.edt)** olarak ayarlandığından emin olun.

31 **Save** öğesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve program yeni şablon dosyasını belirlenmiş klasöre kaydeder.

Gelecekteki analizler için, qRT-PCR deneyini **“ABI 7500 Fast deneyini kayıtlı şablondan oluşturma”** kısmında açıklandığı gibi oluşturmak ve ayarlamak amacıyla kayıtlı şablonu kullanın.

Bu noktada doğrudan **“qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama”**, sayfa 41 kısmına gidin.

ABI 7500 Fast deneyini kayıtlı şablondan oluşturma

Gerekli plaka ayarı ve termal profilin olduğu bir deney şablonu oluşturulmamışsa, bkz. “ABI 7500 Fast deneyini oluşturma ve ayarlama (henüz bir şablon oluşturulmadıysa gereklidir)”, sayfa 27.

Adım 1. Deneyi oluşturma

- 1 ABI 7500 Fast cihazını açın.
- 2 Cihaza bağlı bilgisayardan, 7500 Sistemi Yazılım uygulamasını açın.
- 3 Home ekranında **Set Up** altında, **Template** ögesine tıklayın.
Open iletişim kutusu açılır.
- 4 İletişim kutusunda, şablonun kaydedildiği klasöre gidin.
- 5 **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt** dosyasına doğrudan çift tıklayın.
Cihaz başlatılır.
7500 Sistem Yazılımı açılarak, Experiment ekranında Plate Setup gösterilir.

Adım 2. Deneyi kaydetme

- 6 Ekranın üst kısmında, Save seçenekleri menüsünü genişletmek üzere **Save** düğmesinin yanındaki aşağı oka tıklayın.
- 7 Menüde **Save As** ögesini seçin.
Save As iletişim kutusu açılır.
- 8 Yeni deney dosyası için bir klasör seçin.
- 9 File name alanına deney için bir ad yazın.
- 10 Dosya türünün **Experiment Document Single files (*.eds)** olarak ayarlandığından emin olun.
- 11 **Save** ögesine tıklayın.
İletişim kutusu kapanır ve program deney dosyasını belirlenmiş klasöre kaydeder.
Bu noktada doğrudan “qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama”, sayfa 41 kısmına gidin.

Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma ve ayarlama (kayıtlı protokol ve plaka dosyaları henüz oluşturulmamışsa gereklidir)

İlgili protokol ve plaka dosyaları zaten varsa “Kayıtlı protokol ve plaka dosyalarından Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma”, sayfa 39 kısmına gidin.

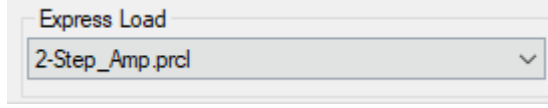
Adım 1. Deneyi oluşturma

- 1 CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR cihazını açın.
- 2 Cihaza bağlı bilgisayardan, Bio-Rad CFX Maestro yazılım uygulamasını açın.
- 3 Startup Wizard içerisinde **Select instrument** açılır listesini **CFX96** olarak ayarlayın, ardından **User-defined** ögesine tıklayın.
Run Setup ekranı açılarak Protocol sekmesi gösterilir. Varsayılan termal profil, ekranın orta kısmında gösterilir.

Adım 2. Termal profili ayarlama

- 4 Express Load açılır listesinde **2-Step_Amp.prcl** ögesini seçin.

Termal profil, floresan problemleriyle kullanılması uygun olan 2 adımlı bir amplifikasyon protokolünün varsayılan ayarlarına güncellenir.



Şekil 12 CFX Maestro Protokol sekmesinde Express Load ayarı **2-Step_Amp.prcl** olarak yapılmış

- 5 **Edit Selected** ögesine tıklayın.

Protocol Editor penceresi açılır.

- 6 Protocol Editor penceresinde, ters transkripsiyon için termal profilin başlangıcına bir adım ekleyin.

a Termal profil görüntüsünde adım 1'i seçin.

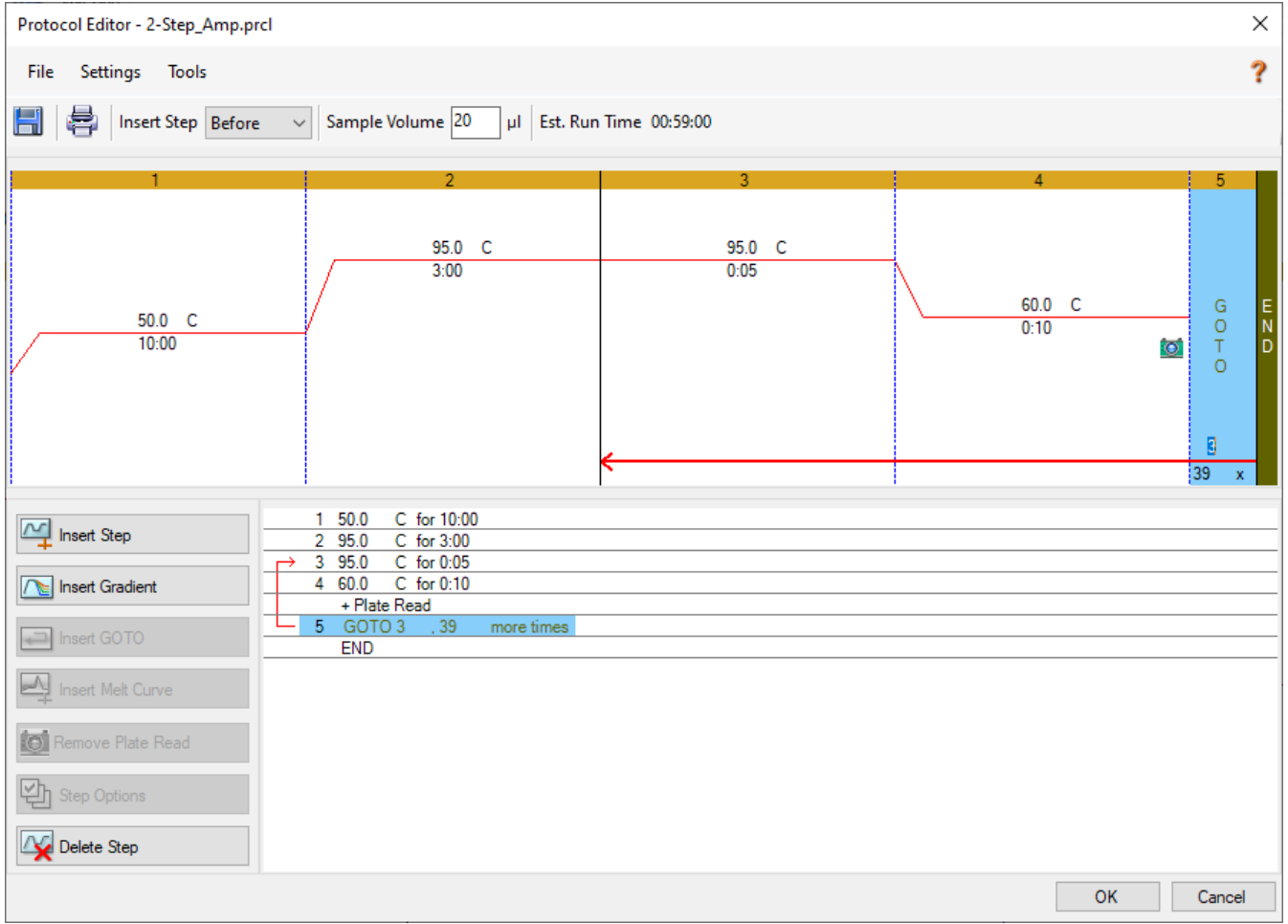
b Insert Step açılır listesinde **Before** ögesini seçin.

c **Insert Step** ögesine tıklayın.

Seçili adımdan önce yeni bir adım 1 eklenir.

d Yeni adımın ayarlarını 10 dakika boyunca 50°C olarak düzenleyin.

- 7 Termal profilin diğer adımlarını **Şekil 13**'te sunulanlarla eşleştirecek şekilde ayarlayın. Ayarlar **Tablo 11**'de de özetlenmektedir. GOTO adımının (adım 5) 39 kez tekrarlanacak şekilde ayarlandığından emin olun.



Şekil 13 CFX Maestro Protokol Düzenleyici penceresinde termal profil

Tablo 11 Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Cihazı için termal döngü programı

Segment Numarası	Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
1	1	10 dakika	50°C
2	1	3 dakika	95°C
3	40	5 saniye	95°C
		10 saniye	60°C

Adım 3. Protokol dosyasını kaydetme

8 Save ögesine tıklayın.

Save As iletişim kutusu açılarak deney için protokol dosyasını kaydetmeniz istenir. Protokol dosyasında, Run Setup ekranının Protocol sekmesinden ayarlar yer alır.

9 Protokol dosyası için bir klasör seçin.

10 File name alanına **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol** yazın.

11 Dosya türünün **Protocol File (*.prcl)** olarak ayarlandığından emin olun.

12 **Save** ögesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve program protokol dosyasını belirlenmiş klasöre kaydeder.

13 Protocol Editor penceresini kapatmak için **OK** ögesine tıklayın.

Gelecekteki analizler için, “**Kayıtlı protokol ve plaka dosyalarından Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma**” kısmında açıklandığı gibi Protocol sekmesini ayarlamak üzere kayıtlı protokol dosyasını kullanın.

Adım 4. Floroforları seçme ve hedef adları atama

14 Run Setup ekranının alt kısmından **Next** ögesine tıklayın.

Run Setup ekranı Plate sekmesine ilerler. Ekranın orta kısmında plaka haritasının bir görüntüsü sunulur.

15 Scan Mode açılır listesinin **All Channels** şeklinde ayarlandığından emin olun.

16 **Edit Selected** ögesine tıklayın.

Plate Editor penceresi açılır.

17 Plate Editor penceresinde **Select Fluorophores** ögesine tıklayın.

Select Fluorophores iletişim kutusu açılır.

18 İletişim kutusunda, **FAM**, **HEX** ve **Cy5** floroforlarının onay kutularını işaretleyin. Diğer tüm floroforların onay kutularını temizleyin. Bkz. **Şekil 14**.

Channel	Fluorophore	Selected	Color
1	FAM	☒	Blue
	SYBR	☐	Green
2	HEX	☒	Dark Green
	TET	☐	Teal
	Cal Orange 560	☐	Orange
	Cal Gold 540	☐	Gold
	VIC	☐	Olive
3	ROX	☐	Red
	Texas Red	☐	Red
	Cal Red 610	☐	Magenta
	Tex 615	☐	Green
4	Cy5	☒	Purple
	Quasar 670	☐	Brown
5	Quasar 705	☐	Dark Red
	Cy5-5	☐	Green

OK Cancel

Şekil 14 CFX Maestro Select Fluorophores iletişim kutusunda florofor seçimleri

19 OK ögesine tıklayın.

Select Fluorophores iletişim kutusu kapanır. Seçili üç florofor, Plate Editor penceresinin sağ tarafında **Target Names** kısmının altında gösterilir.

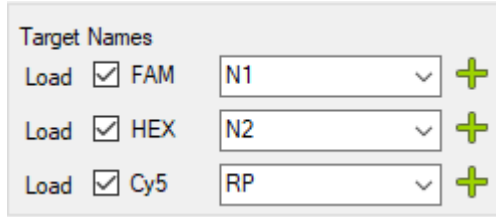
20 Plaka haritasında tüm kuyucukları seçin.

Seçili kuyucuklar mavi renkli olarak vurgulanır.

Plakanın tüm kuyucuklarında bir qRT-PCR reaksiyonu olacaksa 96 kuyucuğun tamamının seçilmesi uygundur. Plaka kuyucuklarından herhangi biri boş olacaksa, bu adımda o kuyucukları seçmeyin.

21 **Target Names** altında, üç floroforun da işaretlendiğinden ve tüm kuyucuklarda üç floroforun adının da gösterildiğinden emin olun.

22 Florofor adlarının yanındaki alanlarda, **Şekil 15**'te sunulduğu gibi floroforların hedef adlarını yazın. Her bir adı yazdıktan sonra, adı plaka kuyucuklarına uygulamak üzere **Enter** tuşuna basın.



Target Names				
Load	☒	FAM	N1	+
Load	☒	HEX	N2	+
Load	☒	Cy5	RP	+

Şekil 15 CFX Maestro Plaka Düzenleyici penceresinde hedef adı atamaları

Adım 5. Örnek türleri ve örnek adları atama

23 Şablonsuz Kontrol örnek türünü atayın.

- a Plaka haritasında kuyucuk A12'yi seçin.
- b Sample Type açılır listesinde **NTC** ögesini seçin.

NTC etiketi, kuyucuk A12'nin üst kısmında gösterilir.

24 Kalan kuyucukların, **Şekil 16**'da sunulduğu gibi kuyucuğun üst kısmındaki **Unk** etiketiyle belirtildiği üzere Bilinmeyen örnek türüne atandığından emin olun.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
B	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
C	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
D	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
F	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
G	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
H	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP

Şekil 16 CFX Maestro Plaka Düzenleyici penceresinde örnek türü atamaları

25 Kuyucuk B12'ye İnsan Numune Kontrol örneği için örnek adı atayın.

a Plaka haritasında kuyucuk B12'yi seçin.

Plakaya dahil edilmesi gereken birden fazla İnsan Numune Kontrolü örneğiniz varsa, plaka haritasında sütun 12'de gerekli ek kuyucuk sayısını seçin.

b **Sample Names** altındaki alana **Şekil 17**'de sunulduğu gibi **HSC** yazın. **Enter** tuşuna basın.

Örnek adı HSC seçili kuyucuklarda gösterilir.

Sample Names

Load ☒ HSC

Şekil 17 CFX Maestro Plaka Düzenleyici penceresinde HSC örnek adı ekleme

26 Kuyucuk H12'de SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolü örneği için örnek adı atayın.

a Plaka haritasında kuyucuk H12'yi seçin.

b **Sample Names** altındaki alana **Pos** yazın. **Enter** tuşuna basın.

Örnek adı Pos kuyucuk H12'de gösterilir.

Adım 6. Plaka dosyasını kaydetme

27 **Save** ögesine tıklayın.

Save As iletişim kutusu açılarak deney için plaka dosyasını kaydetmeniz istenir. Plaka dosyasında, Run Setup ekranının Plate sekmesinden ayarlar yer alır.

28 Plaka dosyası için bir klasör seçin.

29 File name alanına **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate** adını yazın.

30 Dosya türünün **Plate File (*.pltd)** olarak ayarlandığından emin olun.

31 **Save** ögesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve program plaka dosyasını belirlenmiş klasöre kaydeder.

32 Plate Editor penceresini kapatmak için **OK** ögesine tıklayın.

33 Run Setup ekranının alt kısmından **Next** ögesine tıklayın.

Run Setup ekranı Start Run sekmesine ilerler.

Gelecekteki analizler için, "**Kayıtlı protokol ve plaka dosyalarından Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma**" kısmında açıklandığı gibi Plate sekmesini ayarlamak üzere kayıtlı plaka dosyasını kullanın.

Bu noktada doğrudan "**qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama**", sayfa 41 kısmına gidin.

Kayıtlı protokol ve plaka dosyalarından Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma

Gerekli plaka ayarı ve termal profilin olduğu bir deney oluşturulmamışsa, bkz. "**Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR deneyini oluşturma ve ayarlama (kayıtlı protokol ve plaka dosyaları henüz oluşturulmamışsa gereklidir)**", sayfa 33.

Adım 1. Deneyi oluşturma

1 CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR cihazını açın.

2 Cihaza bağlı bilgisayardan, Bio-Rad CFX Maestro yazılım uygulamasını açın.

3 Startup Wizard içerisinde **Select instrument** açılır listesini **CFX96** olarak ayarlayın, ardından **User-defined** ögesine tıklayın.

Run Setup ekranı açılarak Protocol sekmesi gösterilir. Varsayılan termal profil, ekranın orta kısmında gösterilir.

Adım 2. Protokol dosyasını yükleme

4 **Select Existing** ögesine tıklayın.

Select Protocol iletişim kutusu açılır.

- 5 İletişim kutusunda, **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prc1** dosyasının kaydedildiği klasöre gidin.
- 6 Doğrudan protokol dosyasına çift tıklayın.
Protokol dosyasındaki ayarlar deneye yüklenir.

Adım 3. Plaka dosyasını yükleme

- 7 Run Setup ekranının alt kısmından **Next** öğesine tıklayın.
Run Setup ekranı Plate sekmesine ilerler. Ekranın orta kısmında plaka haritasının bir görüntüsü sunulur.
- 8 **Select Existing** öğesine tıklayın.
Select Plate iletişim kutusu açılır.
- 9 İletişim kutusunda, **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd** dosyasının kaydedildiği klasöre gidin.
- 10 Doğrudan plaka dosyasına çift tıklayın.
Plaka dosyasındaki ayarlar deneye yüklenir.
- 11 Run Setup ekranının alt kısmından **Next** öğesine tıklayın.
Run Setup ekranı Start Run sekmesine ilerler.
Bu noktada doğrudan **“qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama”**, sayfa 41 kısmına gidin.

qRT-PCR Reaksiyonlarını Hazırlama

DİKKAT

qRT-PCR plakasını kullanmadan hemen önce hazırlayın ve gerçek zamanlı PCR cihazına yüklenene kadar daima buz üzerinde veya soğuk rak içinde tutun.

Adım 1. PCR öncesi iş istasyonunda qRT-PCR reaktif karışımını ve plakayı hazırlama

- 1 Donmuş qRT-PCR reaktifleri varsa buz üzerinde çözündürün. Gerekli reaktif listesi için bkz. **Tablo 12**. 10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx ve Reference Dye Dx'i ışıktan korunmuş halde muhafaza edin.
- 2 Nükleaz içermeyen suyla temin edilen Reference Dye Dx'in 1:500 oranında seyreltisini hazırlayın (reaksiyonlarda 30 nM son konsantrasyon için). Referans boyayı içeren tüm çözeltileri ışıktan korunmuş halde tutun.

Seyreltilmiş Reference Dye Dx, 4°C'de ışıktan korunmuş tüpte saklandığında, gün içerisinde ilave analizler ayarlanması için kullanılabilir.
- 3 **Tablo 12**'deki bileşenleri listelenen sırada birleştirerek reaktif karışımını hazırlayın. Aşağıda listelenen bileşenlerden birden fazlasını kullanarak tüm örnekler için tek bir reaktif karışımı hazırlayın (3 kontrol ve 93 adede kadar test örneği). Reaktif karışımını buz üzerinde ve ışıktan korunmuş halde tutun. Kullanmadan hemen önce reaktif karışımını hazırlayın.
 - 96 reaksiyon hazırlıyorsanız, reaktif karışımını 2 ml tüp içinde hazırlayın.
 - 48 reaksiyon hazırlıyorsanız, reaktif karışımını 1,5 ml tüp içinde hazırlayın.
Kolaylık sağlaması açısından **Tablo 12**'de, 1 reaksiyon, 48 reaksiyon ve 96 reaksiyonun hazırlanması için hacimler yer alır.

Tablo 12 qRT-PCR Reaktif Karışımı

Bileşen	1 reaksiyon için hacim	48 reaksiyon için hacim (fazlalık dahil)	96 reaksiyon için hacim (fazlalık dahil)
Nükleaz içermeyen su	1,5 µl	81 µl	162 µl
2× Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1080 µl
10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx	2 µl	108 µl	216 µl
100 mM DTT Dx	0,2 µl	10,8 µl	21,6 µl
Seyreltilmiş Reference Dye Dx (adım 2 'den)	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

- 4 Reaktif karışımını kabarcık oluşturmada vorteks karıştırıcıda nazikçe karıştırın, ardından tüpü 5 saniye boyunca mikrosantrifüjde döndürün.
- 5 15 µl reaktif karışımını aşağıdaki prosedürü kullanarak 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına dağıtın.
 - a 96 kuyucuklu soğuk rak içine temiz, 8× tüp stripi koyun.

- b 190 µl reaktif karışımını (96 reaksiyon çalıştırılıyorsa) veya 100 µl reaktif karışımını (48 reaksiyon çalıştırılıyorsa) stripteki 8 tüpün her birine dağıtın. Gerekirse, tüplerin alt kısmında mevcut olabilecek büyük kabarcıkları çıkarın.
- c Çok kanallı pipetörle, 8 kuyucuklu strip tüpünden 15 µl reaktif karışımını, 96 kuyucuklu plakanın sütunlarına aktarın. Proses boyunca plakayı buz üzerinde ya da 96 kuyucuklu soğuk rak içinde ve ışıktan korunmuş halde tutun.

NOT

Yalnızca 48 reaksiyon çalıştırıyorsanız, sütun 1 ila 6'yı boş bırakın.

- 6 Plakanın üzeri kapalıyken, plakayı örnek ekleme için belirlenmiş PCR öncesi iş istasyonu alanına alın. Plakayı buz üzerinde veya soğuk rak içinde tutun.

Adım 2. Kontrol ve test örneklerini PCR öncesi iş istasyonunda (örnek ekleme alanı) qRT-PCR plakasına ekleme

- 7 SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolünü, 10 kopya/µl çalışma stoğuna seyreltin.
 - a Nükleaz içermeyen 99 µl suyu, temiz 1,5 ml tüp içine ekleyin. Bu tüpe, seyreltilmemiş SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolünün 1 µl'lik kısmını ekleyin. Vorteks karıştırıcıda iyice karıştırın, ardından mikrosantrifüj içinde kısa süreli döndürün.
 - b Nükleaz içermeyen 99 µl suyu, başka bir temiz 1,5 ml tüp içine ekleyin. Bu tüpe, **adım a**'da hazırlanan, seyreltilmiş SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolünün 1 µl'lik kısmını ekleyin. Vorteks karıştırıcıda iyice karıştırın, ardından mikrosantrifüj içinde kısa süreli döndürün.

Bu tüp, SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolünün çalışma stoğunu, 10 kopya/µl konsantrasyonda içerir.

Çalışma stoğu 4°C'de saklandığında, gün içerisinde ilave analizler ayarlanması için kullanılabilir. SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolünün başlangıçtaki stoğunu -80°C'ye geri getirin.

- 8 Kontrol reaksiyonlarını **Şekil 18**'de sunulduğu gibi ayarlayın.
 - Şablonsuz Kontrol (NTC) için, nükleaz içermeyen 5 µl suyu kuyucuk A12'ye ekleyin.
 - İnsan Numune Kontrolü (HSC) için, İnsan Numune Kontrolünden hazırlanan RNA'yı kısa süreli vorteksleyin. Ardından kuyucuk B12'ye 5 µl RNA ekleyin.

Plakaya dahil edilmesi gereken birden fazla HSC örneğiniz varsa, plakayı qRT-PCR cihazı yazılımında ayarlarken sütun 12'de belirlenmiş biçimde ilave kuyucuklar kullanın.

 - SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolü için (Pos), seyreltilmiş SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolünün 5 µl'lik kısmını kuyucuk H12'ye ekleyin.
- 9 Test örnekleri için reaksiyonları (S1 ila S93) **Şekil 18**'de sunulduğu gibi ayarlayın. Kontaminasyon oluşmasını önlemek için sık sık eldiven değiştirin.
 - Test örneklerinden hazırlanan RNA örneklerini kısa süreli vorteksleyin. Ardından 5 saniye boyunca mikrosantrifüjde döndürün.
 - Her örnek için qRT-PCR plakasının bir kuyucuğuna 5 µl ekleyin. Her kuyucuğa hangi örneğin eklendiğini dikkatlice izleyin. Her ekleme sonrasında uçları değiştirin.
 - qRT-PCR plakası yapışkan sızdırmazlıkla kapatılacaksa kabarcık oluşturmaktan karışımları yukarı ve aşağı kısa süreli olarak pipetleyip, kapatmadan önce reaksiyonları karıştırın.

NOT

Yalnızca 48 reaksiyon çalıştırıyorsanız, S1 ila S48 için etiketlenmiş plaka kuyucuklarını boş bırakın.

- 10 Plakayı yapışkan sızdırmazlıkla veya tüp kapağı stripleriyle kapatın.
- 11 Plaka tüp kapağı stripleriyle kapatıldıysa vorteks karıştırıcıda kısa süreli karıştırın. (Yapışkan sızdırmazlıkla kapatılmış plakalar için vorteks karıştırıcı kullanmayın.)
- 12 Plakayı, plaka santrifüjü içinde kısa süreli döndürün.
- 13 Agilent AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sistemini kullanıyorsanız ve plakayı yapışkan sızdırmazlıkla kapattıysanız, plaka üzerine bir sıkıştırma pedi ekleyin.
- 14 Gerçek zamanlı PCR sisteminizde doğrudan qRT-PCR gerçekleştirmeye geçin.
 - Bkz. **“Agilent AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme”**, sayfa 45
 - Bkz. **“ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazında qRT-PCR Gerçekleştirme”**, sayfa 53
 - Bkz. **“Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme”**, sayfa 60

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	NTC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	HSC
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S89
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S90
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S91
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S92
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S93
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	Pos

Şekil 18 Test örneği 1-93 ve kontrol örnekleri (Şablonsuz Kontrol [NTC], İnsan Numune Kontrolü [HSC] ve Synthetic Positive RNA Control Dx [Pos]) için plaka ayarı

5

qRT-PCR Gerçekleştirme Talimatları

Agilent AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme	45
ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazında qRT-PCR Gerçekleştirme	53
Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme	60

Bu bölümde, seçili Gerçek Zamanlı PCR cihazında qRT-PCR döngü programı gerçekleştirmeyle ilgili talimatlar yer almaktadır.

Agilent AriaMx/AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme

Bu bölümde, Agilent AriaMx ya da AriaDx Gerçek Zamanlı PCR Sisteminde qRT-PCR gerçekleştirmeyle ilgili prosedür açıklanmaktadır.

AriaMx/AriaDx sisteminde qRT-PCR programını çalıştırma

- 1 AriaMx/AriaDx cihazının açık olduğundan emin olun.
- 2 Cihaza bağlı bilgisayardan, Aria uygulamasında daha önce oluşturduğunuz deneyi açın.
- 3 Thermal Profile ekranına, Run Status ekranına veya Raw Data Plots ekranına gidin.
- 4 **Run** ögesine tıklayın.
Instrument Explorer iletişim kutusu açılır.
- 5 Çalıştırma için kullanacağınız cihazı bulun ve **Send Config** ögesine tıklayın. (Cihaz arama ve eklemeye ilgili talimatlar için AriaMx ya da AriaDx Kurulum ve Kullanım Kılavuzuna bakın.)
 - Aria programını son başlattığınızdan bu yana ilk defa bir cihaza bağlanıyorsanız, Login iletişim kutusu açılır. Açılır listeden Username seçin, Password alanına oturum açma parolanızı yazın ve **Login** ögesine tıklayın. Farklı bir kullanıcı hesabıyla oturum açmak için, cihaz adına sağ tıklayın ve **Log off current user** ögesine tıklayın. Ardından, istediğiniz kullanıcı hesabını kullanarak oturum açabilirsiniz.
 - Deney henüz kaydedilmediyse, devam etmeden önce deneyi kaydetmeniz istenir.
- 6 Reaksiyon plakanızı cihaza götürün ve termal blok içine yükleyin.
- 7 Cihazın dokunmatik ekranında, Thermal Profile ekranında hazırlanmış deneyi açın ve **Run Experiment** ögesine basın.
Cihaz, deneyi çalıştırmaya başlar.
- 8 Bilgisayar programına dönün. Program sizi Run Status ekranına götürür; buradan, çalıştırmanın ilerleme durumunu izleyebilirsiniz.
Çalıştırmanın izlenmesi zorunlu değildir. Çalıştırma tamamlanmadan önce Aria yazılımını kapatırsanız, çalıştırma sonrası deney dosyasının kaydedileceği yeri not edin.

AriaMx/AriaDx deneyi için veri analizi ayarları atama

Adım 1. Tüm kuyucuklardaki tüm hedefler için amplifikasyon çizimlerini görüntüleme

1 Çalıştırma tamamlandığında, Aria yazılımında deney dosyasını açın.

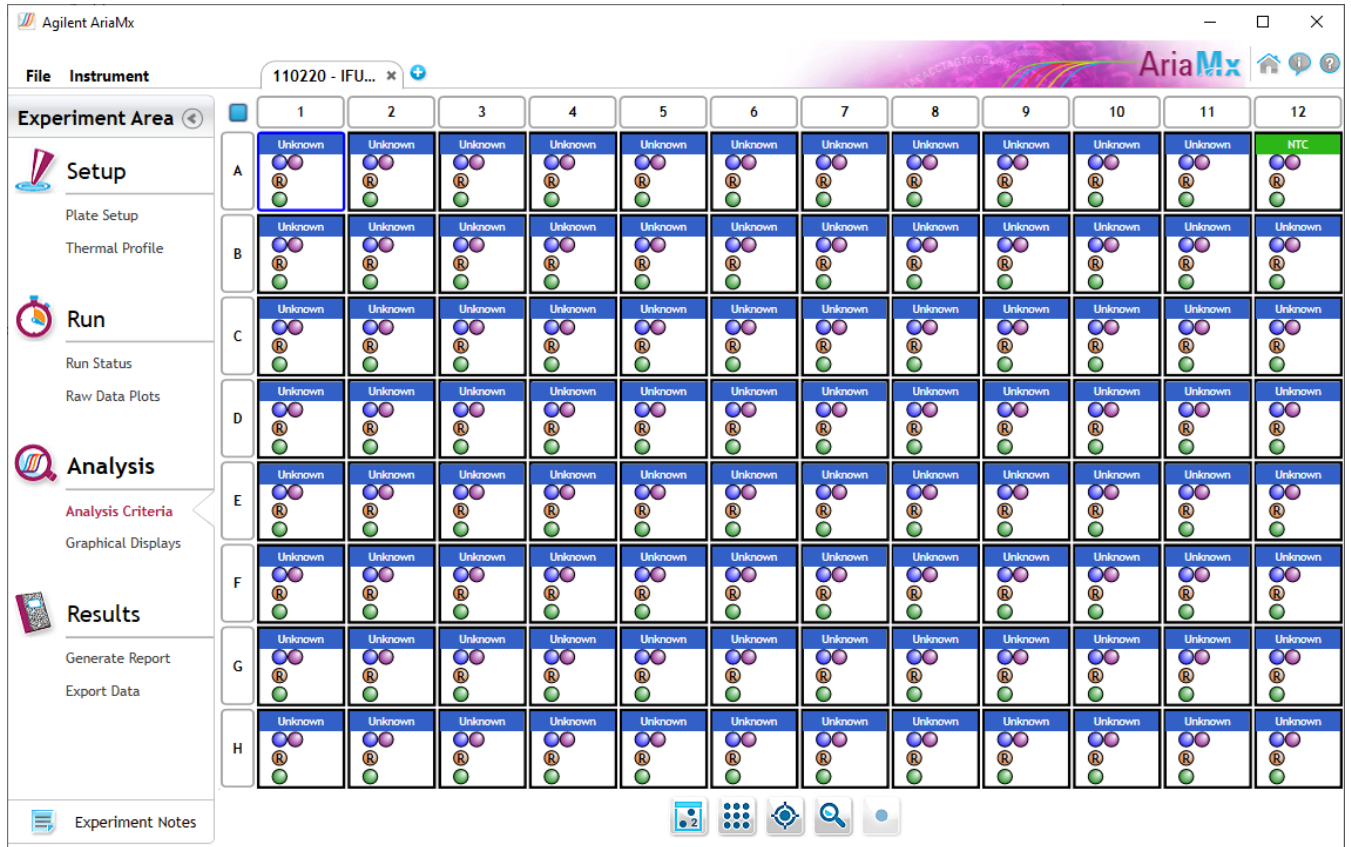
2 Ekranın sol tarafında **Analysis Criteria** ögesine tıklayın.

Analiz için ayarların belirtilmesine dair ayarların yer aldığı Analysis Criteria ekranı açılır.

3 **Şekil 19**'da sunulduğu gibi tüm kuyucukların, kuyucuk türlerinin ve hedeflerin analiz için seçildiğinden emin olun.

NOT

Plakada boş kuyucuklar varsa bu kuyucukların Plate Setup sekmesinde Blank kuyucuk türüne atandığından emin olun.



Şekil 19 Aria Analiz Kriterleri ekranı

4 Ekranın sol tarafındaki **Graphical Displays** ögesine tıklayın.

Analiz parametrelerinin ayarlanmasına yönelik araçlarla verilerin gösterildiği Graphical Displays ekranı açılır.

5 Ekranda Amplification Plots grafiğinin gösterildiğinden ve varsayılan analiz parametrelerinin **Şekil 20**'de sunulanlarla eşleştiğinden emin olun.

Şekil 20'de sunulan analiz parametrelerinin bütün panelini görmüyorsanız, paneli genişletmek üzere **Smoothing** ayarının hemen altındaki aşağı oka tıklayın.

Deneyinizdeki varsayılan Threshold Fluorescence değerlerinin **Şekil 20**'de sunulanlardan muhtemelen farklı olacağını unutmayın. Yazılım, arka plan döngü aralığındaki floresan parazit seviyesine göre varsayılan değerleri hesaplar. Sonuç olarak, varsayılan değerler deneyler arasında farklılık gösterir.

Şekil 20 Aria yazılımında Amplifikasyon Çizimleri için varsayılan ayarlar (Eşik Floresan değerleri deneyler arasında farklılık gösterir)

- 6 **Background Based Threshold** altında, varsayılan döngü aralığının 5 ila 9 olduğundan emin olun.
- 7 Erken amplifikasyon olan amplifikasyon çizimlerini kontrol edin (ör. döngü 9'dan önce). Erken amplifikasyonu olan test örneklerini analizden dışarıda tutun ve daha düşük bir konsantrasyonda tekrar test edin.

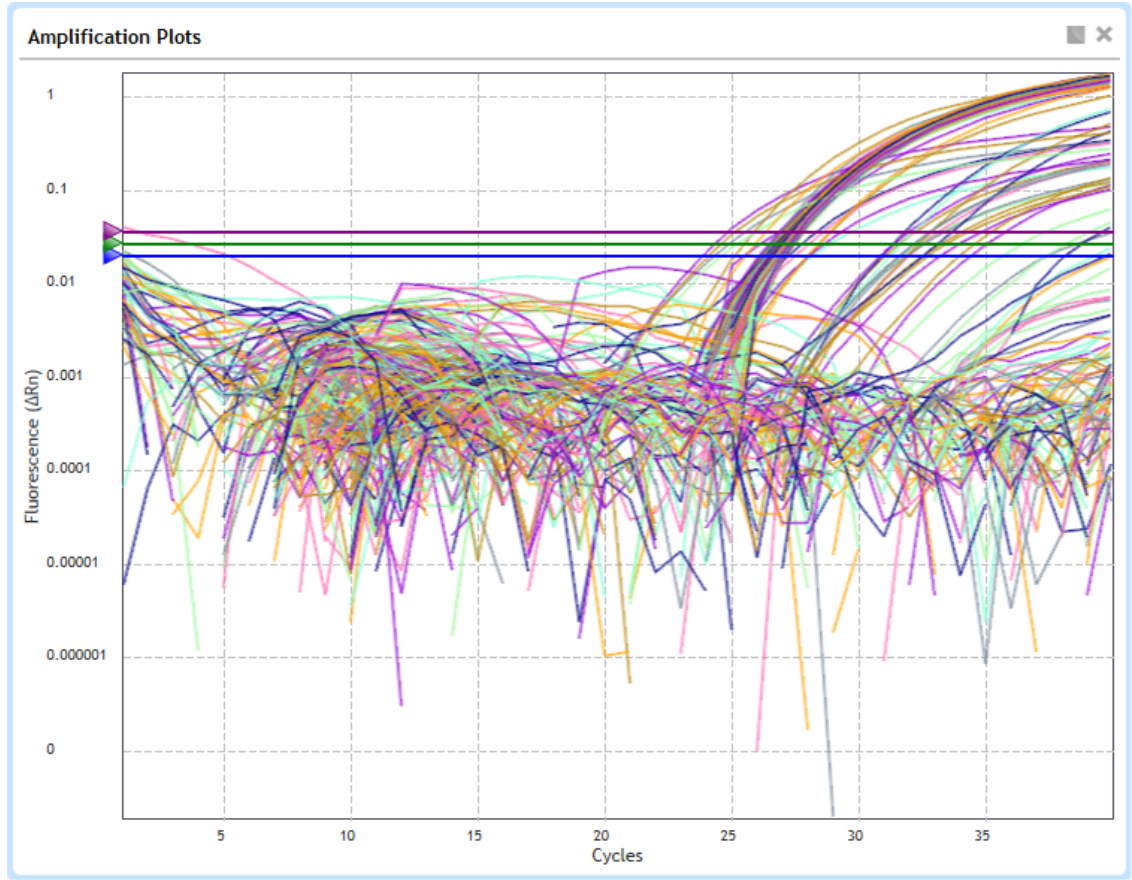
Olağandışı şekilde yüksek viral RNA konsantrasyonları olan test örneklerinde, viral hedeflerin amplifikasyonu çok erken bir döngü numarasında (<9) tespit edilebilir düzeylere ulaşabilir. Başlangıçtaki düzeltme hesaplamalarının parçası olarak yazılım, bu gibi erken amplifikasyon sinyallerini arka plan paraziti olarak yorumlayabilir ve bu örneklerdeki viral hedeflere bir C_q değeri atamayabilir.

Başlangıç düzeltmesi olmayan Amplifikasyon Çizimlerini görüntüleyerek (Floresan Terimi R veya R_n) bu gibi test örnekleri olup olmadığını izleyin. Test örneklerinin herhangi biri, döngü 9'dan önce amplifikasyon belirtileri gösterirse, Analysis Criteria ekranından seçimlerini kaldırarak bu kuyucukları analizden çıkarın. İlgili elüsyon tamponunu kullanarak nükleik asidi 1:100 oranında seyreltip örnek için qRT-PCR reaksiyonunu tekrar çalıştırın.

Adım 2. Eşik değerlerini değerlendirme

- 8 Graph Type ayarında seçimi **Linear** iken **Log** olarak değiştirin. Fluorescence Term'in **ΔR_n** olarak ayarlandığından emin olun.

Amplifikasyon Çizimleri log değerlerinde görüntülendiğinde arka plan sinyal parazitinin daha iyi görünümü sağlanır. Bir örnek **Şekil 21**'de sunulmaktadır. Her hedef için eşik çizgisi yatay çizgi olarak gösterilir.



Şekil 21 Log ölçeğinde Aria Amplifikasyon Çizimleri — hedef eşikler yatay çizgiler olarak gösterilir

9 N1 hedefi için amplifikasyon çizimlerini ve varsayılan eşiği görsel olarak değerlendirin.

- Grafiğin altında bulunan hedefleri görüntüle simgesine tıklayın. 
- Açılan menüde, Amplifikasyon Çizimleri grafiğinde yalnızca N1 hedefinin görünmesini sağlayacak şekilde diğer tüm hedeflerin kutularını temizleyin.
- Eşiğin hem arka plan parazitinin üstünde olacak kadar yüksek hem de üssel amplifikasyon fazında çizimleri içerecek kadar düşük olup olmadığını belirleyin (bkz. **Şekil 23**). Bu saptama temelinde **Tablo 13**'te yönlendirildiği gibi ilerleyin.

10 Adım 9'u N2 hedefi için ve yine RP hedefi için tekrarlayın.

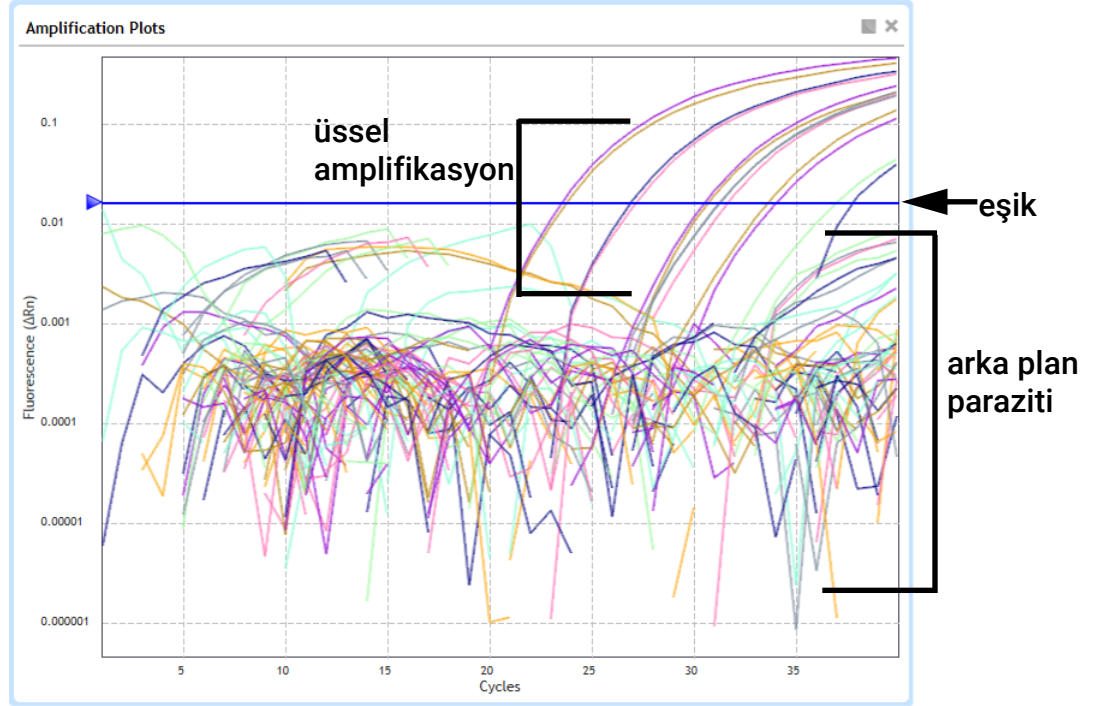
11 Threshold Fluorescence altında, **Şekil 22**'de sunulduğu gibi üç hedefin de işaretlendiğinden ve üç Threshold Fluorescence değerinin de kilitlendiğinden emin olun.

12 Grafiğin altında bulunan hedefleri görüntüle simgesine tıklayın.  Tüm hedeflerin seçildiğinden emin olun.

Threshold Fluorescence:

☒ N1	-	0.021	+		
☒ N2	-	0.028	+		
☒ RP	-	0.038	+		

Şekil 22 Hedefler seçili ve Eşik Floresan değerleri kilitli



Şekil 23 N1 hedefi için Aria Amplifikasyon Çizgileri

Tablo 13 Aria yazılımında optimum eşik ayarını doğrulama

Eşik konumu	Açıklama	İşlem
Optimum konum	Arka plan parazitinin üstünde ve üssel amplifikasyon fazında tüm çizimleri içeriyor	Kilit simgesine tıklayarak, ekranın sağ tarafındaki Threshold Fluorescence değerini kilitleyin. Değer kilitlendiğinde, kilit simgesi kapalı konumda olur. Değer kilitlenirse, herhangi bir analiz kriteri değiştirildiğinde değer değiştirilmez.
Çok yüksek	Üssel amplifikasyon fazındaki bazı çizimler eşiği geçmez	- Arka plan paraziti istisnai şekilde yüksek olan kuyucuklara bakın. Bunun gibi aykırı kuyucuklar yazılımın eşiği çok yükseğe ayarlamasına neden olabilir. - O kuyucuğu analizin dışında bırakmak için Analysis Criteria ekranına geri gidin. Aykırı kuyucuk dışarıda bırakıldığında yazılım eşiği tekrar hesaplar. Alternatif olarak, grafikte eşik çizgisini yeni bir konuma manuel olarak sürüklemek için fareyi kullanın. - Yeni eşiğin optimum konumda olduğunu doğrulayın ve Threshold Fluorescence değerini yukarıda açıklandığı gibi kilitleyin. - Yeni değer kilitlendiğinde, Analysis Criteria ekranına bir kez daha dönerek, aykırı kuyucuğu analize tekrar dahil edin.* * Aykırı kuyucuk için amplifikasyon çizimi, herhangi bir döngü numarasında üssel amplifikasyon göstermiyorsa, düşürülen eşiğin yazılımın kuyucuğa bir Cq değeri atamasına neden olmadığından emin olun (arka plan sinyal parazitinin eşiği geçmesi nedeniyle). Neden oluyorsa, o kuyucuk için diğer analiz ayarlarını değiştirmeyi deneyin, ör. Başlangıç Düzeltme ayarını değiştirin.
Çok düşük	Bazı çizimler arka plan parazitinin üstünde olmaz.	Eşiği, arka plan parazit seviyesinin hemen üstüne yükseltin.

Adım 3. NTC kuyucuğunda sonuçları doğrulama

13 Results Tablosunda, kuyucuk A12'de bulunan Şablonuz Kontrol (NTC) reaksiyonunu bulun.

14 Üç hedef için de Cq sütununda "No Cq" olduğundan ya da Cq değerinin >37,00 olduğundan emin olun.

Herhangi bir hedef için NTC reaksiyonunda Cq değeri $\leq 37,00$ ise, örnek kontaminasyonu meydana gelmiş olabilir. Çalıştırmayı geçersiz kılın ve kılavuzlara kati şekilde uyarak analizi tekrar edin.

Aria yazılımından verileri dışa aktarma

Adım 1. Dışa aktarma ayarlarını tanımlama ve kaydetme

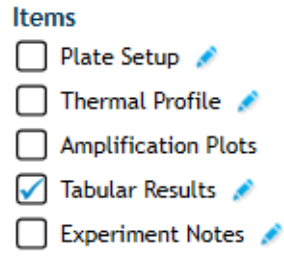
Dışa aktarma ayarları zaten kaydedilmişse, doğrudan "**Adım 2. Verileri dışa aktarma**", sayfa 52 kısmına gidin.

1 Ekranın sol tarafında, **Results** kısmının altında **Export Data** ögesine tıklayın.

Export Data ekranı açılır.

2 Export Configuration panelinde, dışa aktarılan veriler için bir dosya türü seçin, ör. **Excel**.

3 **Items** altında, Tabular Results onay kutusunun işaretli olduğundan emin olun. Diğer öğelerin onay kutularını temizleyin. Bkz. **Şekil 24**.

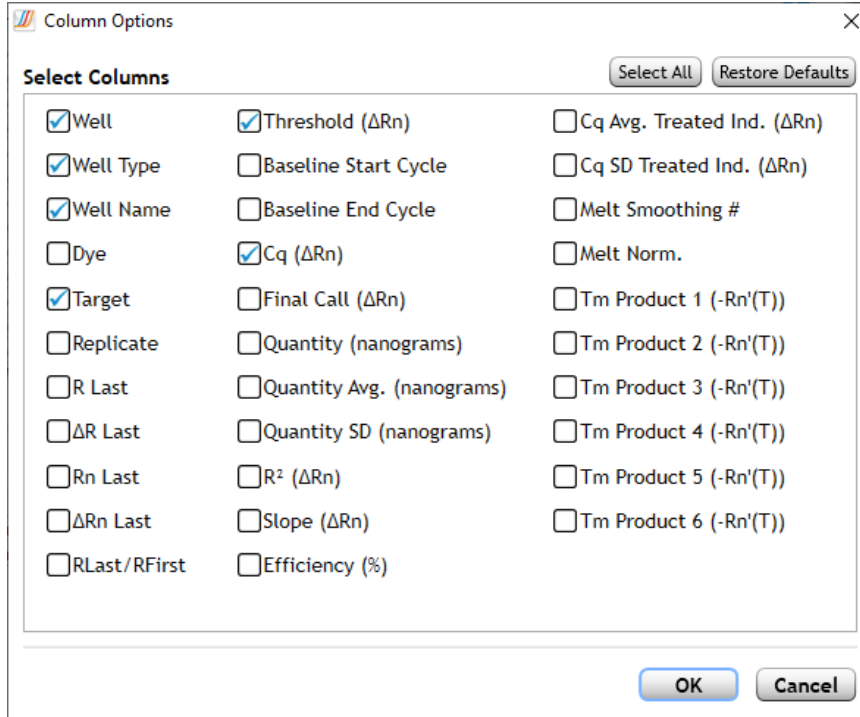


Şekil 24 Aria yazılımı Veri Dışa Aktarma ekranı — Dışa aktarılabacak öğeler

- 4 Hangi veri sütunlarının dahil edileceğini özelleştirmek üzere **Tabular Results** öğesinin yanındaki kurşun kalem simgesine tıklayın.

Column Options iletişim kutusu açılır.

- 5 Dahil edilmek üzere işaretlenmiş sütunlar yalnızca **Şekil 25**'te gösterilenler olacak biçimde ayarları değiştirin.



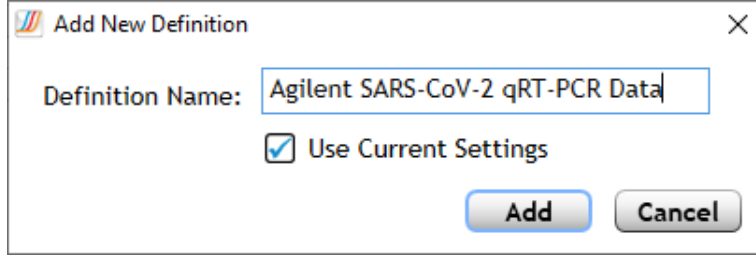
İşaretli sütunlar:

Well
Well Type
Well Name
Target
Threshold
Cq

Şekil 25 Aria Column Options iletişim kutusu

- 6 Değişikliklerinizi kaydetmek ve iletişim kutusunu kapatmak için **OK** öğesine tıklayın.
- 7 Dışa aktarma ayarlarını yeni bir tanım olarak kaydedin.
 - a Export Configuration panelinde Definition açılır listesini genişletin.
 - b **Add New** öğesine tıklayın.
Add New Definition iletişim kutusu açılır.
 - c Definition Name alanına **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data** yazın. Bkz. **Şekil 26**.
 - d Use Current Settings onay kutusunun işaretli olduğundan emin olun.

e **Add** ögesine tıklayın.



Şekil 26 Aria Add New Definition iletişim kutusu

Adım 2. Verileri dışa aktarma

- 8 Export Configuration panelinde Definition açılır listesinin **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data** olarak ayarlandığından emin olun.
- 9 **Export Data** ögesine tıklayın.
Rapor, seçilen dosya türü için varsayılan uygulamada açılır.
- 10 Sonuçları yorumlamak için, test örneklerinin ve kontrollerin her birinde Cq verilerini inceleyin.
Bkz. **Bölüm 6**, “Analiz ve Sonuçlar.”

ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazında qRT-PCR Gerçekleştirme

Bu bölümde, Applied Biosystems 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazında qRT-PCR gerçekleştirmeye ilgili prosedür açıklanmaktadır.

ABI 7500 Fast Gerçek Zamanlı PCR Cihazında qRT-PCR Programını Çalıştırma

- 1 ABI 7500 Fast cihazının açık olduğundan emin olun.
- 2 Cihaza bağlı bilgisayardan, 7500 yazılımında daha önce oluşturduğunuz deneyi açın.
- 3 Cihazda tepsi kapısına bastırarak kapağı açın. Reaksiyon plakanızı cihazın termal bloğuna yükleyin.
- 4 Tepsi kapısını iterek kapağı kapatın.
- 5 Bilgisayarda **START RUN** ögesine tıklayın.
Cihaz, deneyi çalıştırmaya başlar.

ABI 7500 Fast deneyi için veri analizi ayarları atama

Adım 1. Tüm kuyucuklardaki tüm hedefler için amplifikasyon çizimlerini görüntüleme

- 1 Çalıştırma tamamlandığında, Design & Analysis yazılım uygulamasında deneyi açın.
- 2 Ekranın üst kısmında, zaten seçili değilse Quality Check sekmesine tıklayın. Açılır listede **Amplification Plot** ögesinin seçili olduğundan emin olun.

Ekranda amplifikasyon çizimleri, her kuyucuktaki sonuçların bir tablosu ve plaka haritasının bir şeması gösterilir.

NOT

Plakada boş kuyucuklar varsa, o kuyucuklar için olan tüm hedefleri analizden çıkarın ve tekrar analiz yapın.

- 3 **Actions > Primary Analysis Setting** öğelerine tıklayın.

Primary Analysis Settings iletişim kutusu açılır. Bu iletişim kutusundaki varsayılan ayarlar **Şekil 27**'de sunulmaktadır.

- 4 Ayarın **Şekil 27**'de sunulanlarla eşleştirdiğinden emin olun. Gerekirse **Reset to Default** ögesine tıklayın.

Primary Analysis Setting X

General Well Cq QC Alerts

PCR Stage/Step: Stage 3, Step 2 Algorithm Settings: Baseline Threshold

Target	Use Default	Auto Threshold	Threshold	Auto Baseline	Baseline Start	Baseline End
Default Setting		☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO
N1	☒	☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO
N2	☒	☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO
RP	☒	☒	AUTO	☒	AUTO	AUTO

[Reset to Default](#) [Cancel](#) [Save](#)

Şekil 27 Design & Analysis Primary Analysis Setting iletişim kutusundaki varsayılan ayarlar

5 Save öğesine tıklayın.

Primary Analysis Settings iletişim kutusu kapanır.

6 Analyze düğmesinin köşesinde yeşil renkli bir onay işareti olduğundan emin olun. Yoksa **Analyze** öğesine tıklayın.

7 Erken amplifikasyon olan amplifikasyon çizimlerini kontrol edin (ör. döngü 9'dan önce). Erken amplifikasyonu olan test örneklerini analizden çıkarın ve daha düşük bir konsantrasyonda tekrar test edin.

Olağandışı şekilde yüksek viral RNA konsantrasyonları olan test örneklerinde, viral hedeflerin amplifikasyonu çok erken bir döngü numarasında (<9) tespit edilebilir düzeylere ulaşabilir. Başlangıçtaki düzeltme hesaplamalarının parçası olarak yazılım, bu gibi erken amplifikasyon sinyallerini arka plan paraziti olarak yorumlayabilir ve bu örneklerdeki viral hedeflere bir Cq değeri atamayabilir.

Başlangıç düzeltmesi olmadan Amplifikasyon Çizimlerini görüntüleyerek (**Y Value Rn** olarak ayarlı) bu gibi test örnekleri olup olmadığını izleyin. Test örneklerinin herhangi biri, döngü 9'dan önce amplifikasyon belirtileri gösterirse, Quality Check ekranından kaldırarak o kuyucukları analizden çıkarın. İlgili elüsyon tamponunu kullanarak nükleik asidi 1:100 oranında seyreltip örnek için qRT-PCR reaksiyonunu tekrar çalıştırın.

Adım 2. Eşik değerlerini değerlendirme

8 Amplifikasyon Çizimi grafiğinin hemen üstündeki Ayarlar simgesine tıklayın

Settings iletişim kutusu General sekmesinde açılır.

9 Y Value ayarının ΔRn olarak yapıldığından emin olun.

10 Y Scale açılır listesinde, **Şekil 28**'de sunulduğu gibi seçimi **Linear** iken **Log** olarak değiştirin.

Amplifikasyon Çizimleri log değerlerinde görüntülendiğinde arka plan sinyal parazitinin daha iyi görünümü sağlanır. Bir örnek **Şekil 29**'de sunulmaktadır. Her hedef için eşik çizgisi yatay çizgi olarak gösterilir.

GeneralX AxisY Axis

Plot TitleAmplification Plot

Color ByTarget

Y Value

☒ ΔR_n
☐ R_n

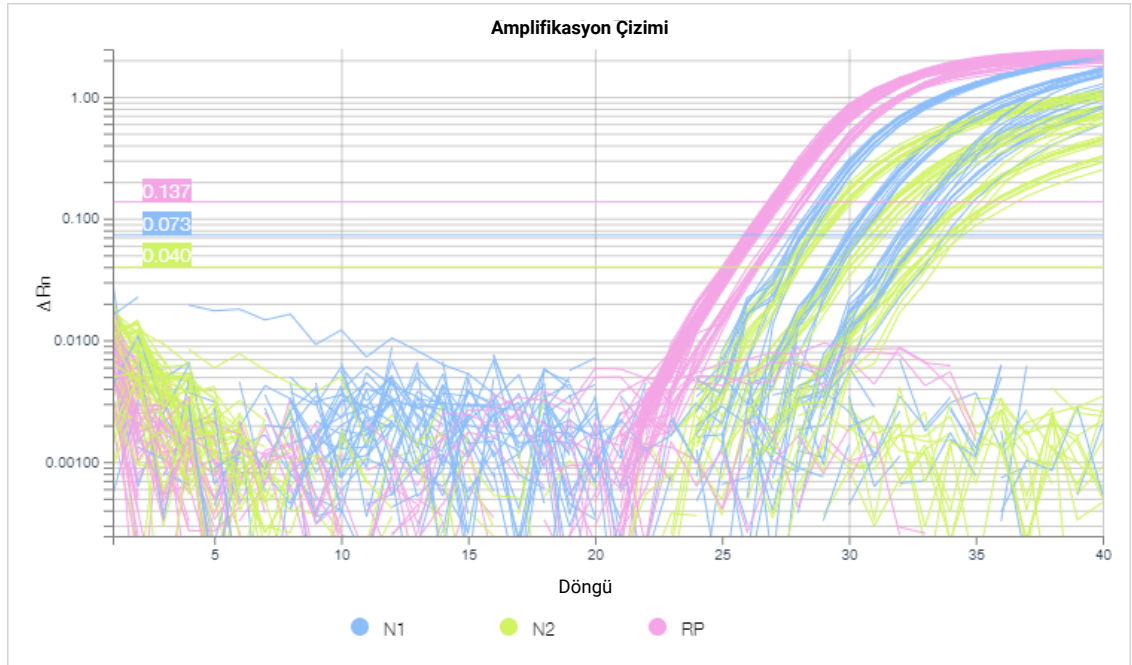
Y ScaleLog

Show

☒ Legend
☐ Cq Mark
☐ Unselected
☐ Tooltip
☐ Replicates of selected
☒ Threshold
☐ Baseline

Reset Setting

Şekil 28 Design & Analysis Amplifikasyon Çizimi Genel Ayarları



Şekil 29 Design & Analysis Amplifikasyon Çizimleri log ölçeğinde – hedef eşikler yatay çizgiler olarak gösteriliyor

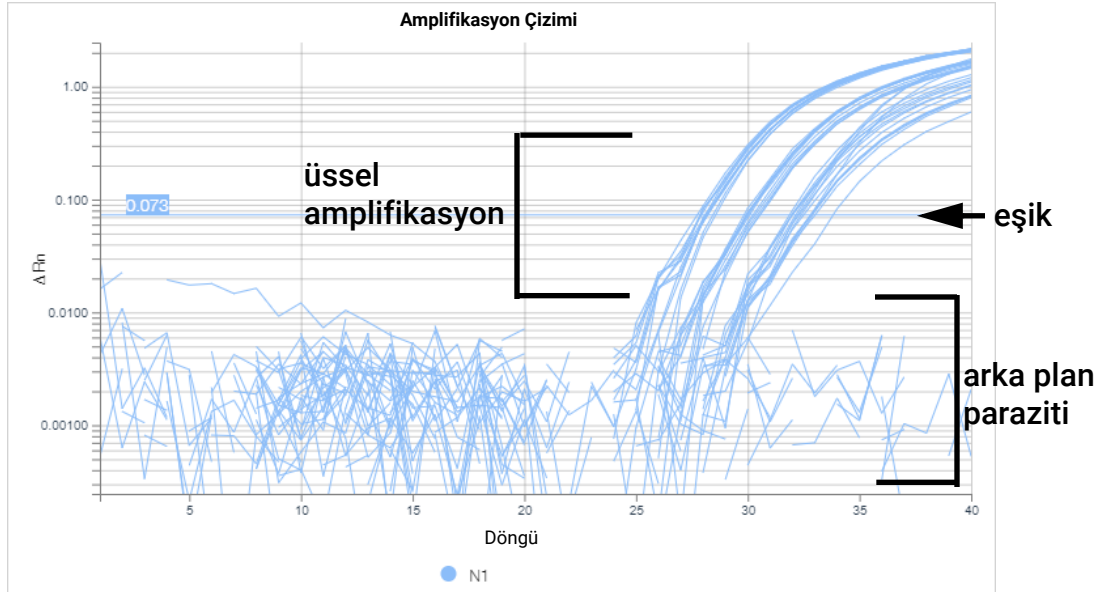
11 N1 hedefi için amplifikasyon çizimlerini ve varsayılan eşiği görsel olarak değerlendirin.

- Ekranın sol tarafında, Targets açılır listesini genişletin.
- Yalnızca N1 hedefini seçin, ardından açılır listeyi daraltın.

- c Eşiğin hem arka plan parazitinin üstünde olacak kadar yüksek hem de üssel amplifikasyon fazında çizimleri içerecek kadar düşük olup olmadığını belirleyin (bkz. **Şekil 30**).
Bu saptama temelinde **Tablo 14**'te yönlendirildiği gibi ilerleyin.

12 Adım 11'i N2 hedefi için ve yine RP hedefi için tekrarlayın.

13 Ekranın sol tarafında **Targets** altında, hedefe göre filtrelemeyi kaldırmak için **Clear all** ögesine tıklayın.



Şekil 30 Design & Analysis N1 hedefi için Amplifikasyon Çizimleri

Tablo 14 Design & Analysis yazılımında optimum eşik ayarını doğrulama

Eşik konumu	Açıklama	İşlem
Optimum konum	Arka plan parazitinin üstünde ve üssel amplifikasyon fazında tüm çizimleri içeriyor	Eşikleri mevcut değerlerinde bırakın.
Çok yüksek	Üssel amplifikasyon fazındaki bazı çizimler eşiği geçmez	- Arka plan paraziti istisnai şekilde yüksek olan kuyucuklara bakın. Bunun gibi aykırı kuyucuklar yazılımın eşiği çok yükseğe ayarlamasına neden olabilir. - Plaka haritasında aykırı kuyucuğu seçin. - Plaka haritasının hemen üstündeki araç çubuğunda, üç nokta bulunan düğmeye tıklayın. Açılan menüde Omit Wells ögesine tıklayın. Analyze ögesine tıklayın. Aykırı kuyucuk dışarıda bırakıldığında yazılım eşiği tekrar hesaplar. Alternatif olarak, grafikte eşik çizgisini yeni bir konuma manuel olarak sürüklemek için fareyi kullanın. - Tüm amplifikasyon çizimlerini görüntülemek için plaka haritasındaki tüm kuyucukları seçin. Yeni eşiğin optimum konumda olduğunu doğrulayın. - Üç nokta bulunan düğmeye tekrar tıklayın. Açılan menüde, aykırı kuyucuğu analize tekrar dahil etmek için Unomit Wells ögesine tıklayın.* * Aykırı kuyucuk için amplifikasyon çizimi, herhangi bir döngü numarasında üssel amplifikasyon göstermiyorsa, düşürülen eşiğin yazılımın kuyucuğa bir Cq değeri atamasına neden olmadığından emin olun (arka plan sinyal parazitinin eşiği geçmesi nedeniyle). Neden oluyorsa, o kuyucuk için diğer analiz ayarlarını değiştirmeyi deneyin, ör. Başlangıç Başlama ve/veya Başlangıç Bitiş döngü sayılarını ayarlayın.
Çok düşük	Bazı çizimler arka plan parazitinin üstünde olmaz.	Eşiği, arka plan parazit seviyesinin hemen üstüne yükseltin.

Adım 3. NTC kuyucuğunda sonuçları doğrulama

14 Kuyucuk Tablosunda, kuyucuk A12'de bulunan Şablonsuz Kontrol (NTC) reaksiyonunu bulun.

15 Üç hedef için de Cq sütununda "Undetermined" olduğundan ya da Cq değerinin >37,00 olduğundan emin olun.

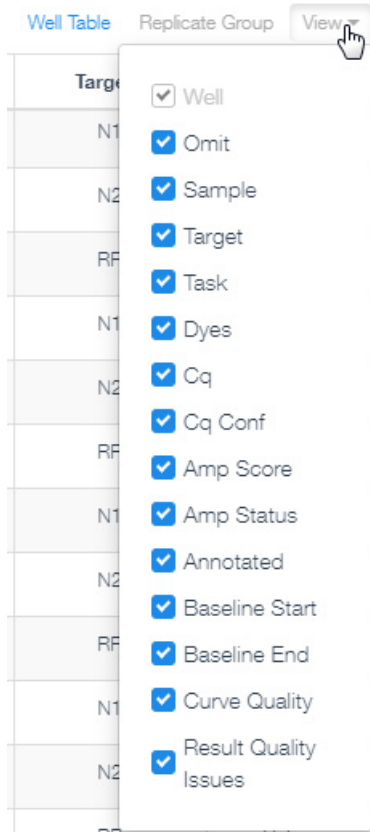
Herhangi bir hedef için NTC reaksiyonunda Cq değeri $\leq 37,00$ ise, örnek kontaminasyonu meydana gelmiş olabilir. Çalıştırmayı geçersiz kılın ve kılavuzlara kati şekilde uyarak analizi tekrar edin.

Design & Analysis yazılımından Kuyucuk Tablosu verilerini CSV dosyasına aktarma

Adım 1. Kuyucuk Tablosunda yer alan sütunları özelleştirme

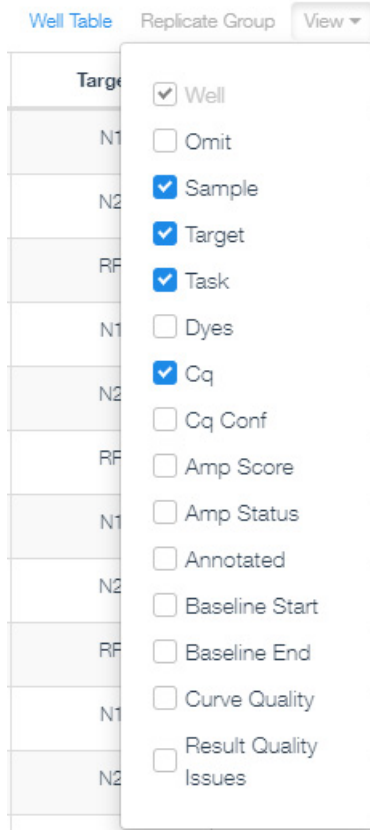
1 Kuyucuk Tablosunun hemen üstündeki araç çubuğunda **View** ögesine tıklayın.

Şekil 31'de sunulduğu gibi, mevcut bütün tablo sütunlarının listelendiği bir menü açılır.



Şekil 31 Design & Analysis Kuyucuk Tablosu için görüntüleme menüsü – varsayılan sütun seçimi

- 2 Dahil edilmek üzere işaretlenmiş sütunlar yalnızca Well, Sample, Target, Task ve Cq olacak biçimde ayarları değiştirin. Bkz. **Şekil 32**.



İşaretli sütunlar:

Sample

Target

Task

Cq

Şekil 32 Design & Analysis Kuyucuk Tablosu için görüntüleme menüsü – özel sütun seçimi

3 Menüü daraltmak için **View** ögesine tıklayın.

Adım 2. Verileri dışa aktarma

4 Kuyucuk Tablosunun hemen üstündeki araç çubuğunda, üç nokta bulunan araç çubuğu düğmesine tıklayın. ...

5 Açılan menüde **Export** ögesine tıklayın.

CSV dosyasının kaydedilmesi için bir iletişim kutusu açılır.

6 Dosya için bir klasör seçin.

7 File name alanına dosya için bir ad yazın.

8 **Save** ögesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve program verileri CSV dosya türü olarak dışa aktarır ve belirlenmiş klasöre kaydeder.

9 Sonuçları yorumlamak için, dosyayı açın ve test örnekleri ile kontrollerin her birinde Cq verilerini inceleyin. Bkz. **Bölüm 6**, “Analiz ve Sonuçlar.”

Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde qRT-PCR Gerçekleştirme

Bu bölümde, Bio-Rad CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde qRT-PCR gerçekleştirmeyle ilgili prosedür açıklanmaktadır.

CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde qRT-PCR programını çalıştırma

- 1 CFX96 Touch cihazının açık olduğundan emin olun.
- 2 Cihaza bağlı bilgisayardan, CFX Maestro yazılım uygulamasında daha önce oluşturduğunuz deneyi açın.
- 3 Run Setup ekranındaki Start Run sekmesine gidin.
Cihaz açıksa ancak **Block Name** altında gösterilmiyorsa, ekranın sol üst köşesindeki **Detect Instrument(s)** öğesine tıklayın.
- 4 Tabloda, deneyin çalıştırılmasında kullanılacak cihazı seçin.
- 5 **Open Lid** öğesine tıklayın.
Cihaz kapağı açılır.
- 6 Reaksiyon plakanızı cihazın termal bloğuna yükleyin.
- 7 Bilgisayarda **Close Lid** öğesine tıklayın.
Cihaz kapağı kapanır.
- 8 **Start Run** öğesine tıklayın.
- 9 Çalıştırma dosyasını istediğiniz klasöre kaydedin. Bir dosya adı girin ve **Save** öğesine tıklayın.
Cihaz, deneyi çalıştırmaya başlar.

CFX96 Touch Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sisteminde veri analizi ayarları atama

Adım 1. Tüm kuyucuklardaki tüm hedefler için amplifikasyon çizimlerini görüntüleme

- 1 Çalıştırma tamamlandığında, CFX Maestro yazılım uygulamasında deneyi açın.
Deney, Data Analysis penceresinde açılır.
- 2 Pencerenin üst kısmında, zaten seçili değilse Quantification sekmesine tıklayın.
Pencerde amplifikasyon çizimleri, her kuyucuktaki sonuçların bir tablosu ve plaka haritasının bir şeması gösterilir.

3 Floresan Sapma Düzeltme özelliğini uygulayın.

- Data Analysis penceresinin üst kısmında **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction** öğelerine tıklayın.

Yazılım, başlangıç döngü aralığında mevcut olabilecek herhangi bir floresan sinyali sapmasını otomatik olarak düzeltir.

4 Erken amplifikasyon olan amplifikasyon çizimlerini kontrol edin (ör. döngü 9'dan önce). Erken amplifikasyonu olan test örneklerini analizin dışında tutun ve daha düşük bir konsantrasyonda tekrar test edin.

Olağandışı şekilde yüksek viral RNA konsantrasyonları olan test örneklerinde, viral hedeflerin amplifikasyonu çok erken bir döngü numarasında (<9) tespit edilebilir düzeylere ulaşabilir. Başlangıçtaki düzeltme hesaplamalarının parçası olarak yazılım, bu gibi erken amplifikasyon sinyallerini arka plan paraziti olarak yorumlayabilir ve bu örneklerdeki viral hedeflere bir Cq değeri atamayıp atamaz.

Başlangıç düzeltmesi olmadan amplifikasyon çizimlerini görüntüleyerek (**Baseline Setting No Baseline Subtraction** olarak ayarlı) bu gibi test örnekleri olup olmadığını izleyin. Test örneklerinin herhangi biri, döngü 9'dan önce amplifikasyon belirtileri gösterirse, Plate Editor penceresinden kaldırarak o kuyucukları analizden çıkarın. İlgili elüsyon tamponunu kullanarak nükleik asidi 1:100 oranında seyreltip örnek için qRT-PCR reaksiyonunu tekrar çalıştırın.

Adım 2. Eşik değerlerini değerlendirme

5 **Settings > Baseline Setting** kısmındaki seçimi kontrol ederek **Baseline Subtracted Curve Fit** şeklinde belirlendiğinden emin olun.

6 Amplifikasyon grafiğine sağ tıklayın ve **Show Threshold Values** öğesini seçin (zaten işaretli değilse).

Her hedef için eşik çizgisi yatay çizgi olarak gösterilir.

7 Amplifikasyon grafiğinin sağ alt köşesinin yakınındaki Log onay kutusunu işaretleyin.

Amplifikasyon çizimleri log değerlerinde görüntülendiğinde arka plan sinyal parazitinin daha iyi görünümü sağlanır.

8 Y eksenini için minimum değeri 0,0 olarak ayarlayın.

- a Amplifikasyon grafiğinin sağ tarafındaki Çizelge Ayarları simgesine tıklayın. 

Chart Settings iletişim kutusu açılır.

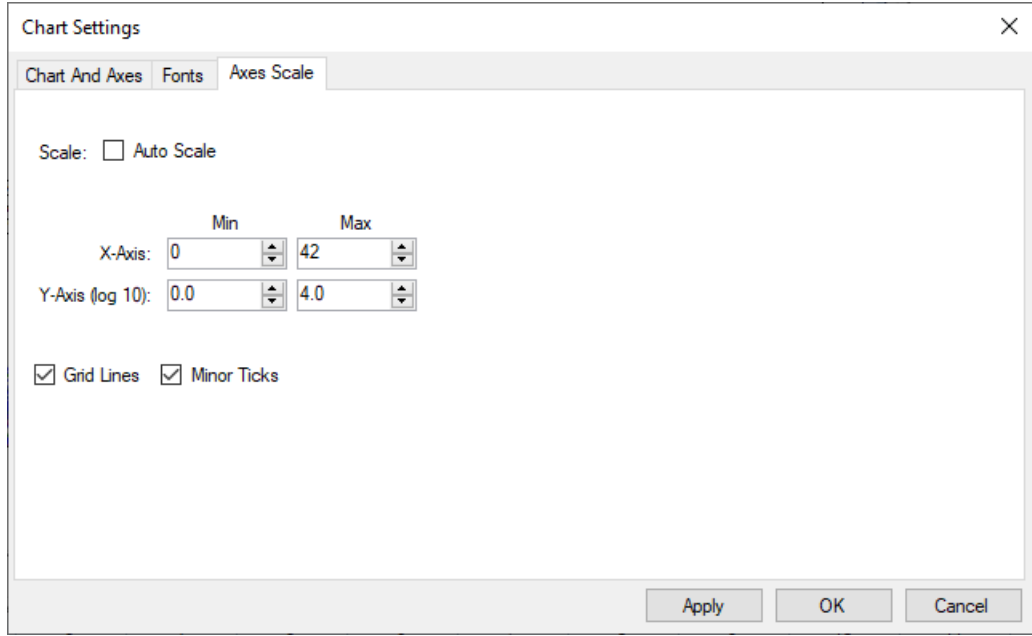
- b Axes Scale sekmesine tıklayın.

- c Auto Scale onay kutusunu temizleyin.

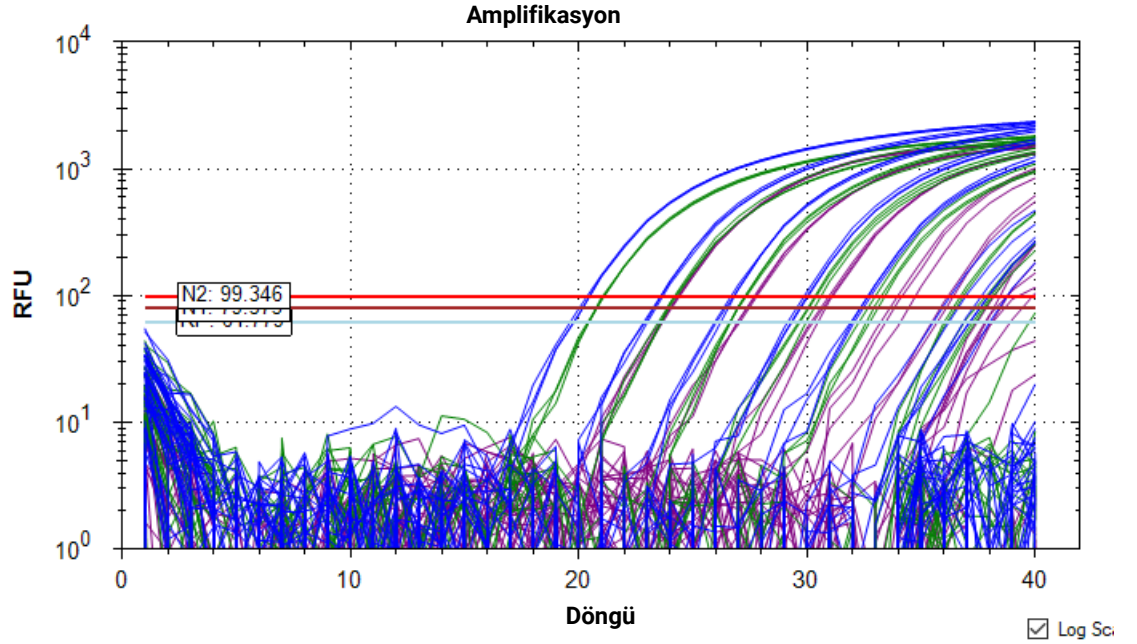
- d **Y-Axis (log 10)** için **Min** sütununda, **Şekil 33**'te gösterildiği gibi **0,0** yazın.

- e **OK** öğesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve Y eksenini ölçeği 0,0'dan başlanarak, çizimlerde sinyal parazitinin gösterilmesine olanak tanır. Bir örnek **Şekil 34**'de sunulmaktadır.



Şekil 33 Maestro Chart Settings iletişim kutusu – Axes Scale sekmesi

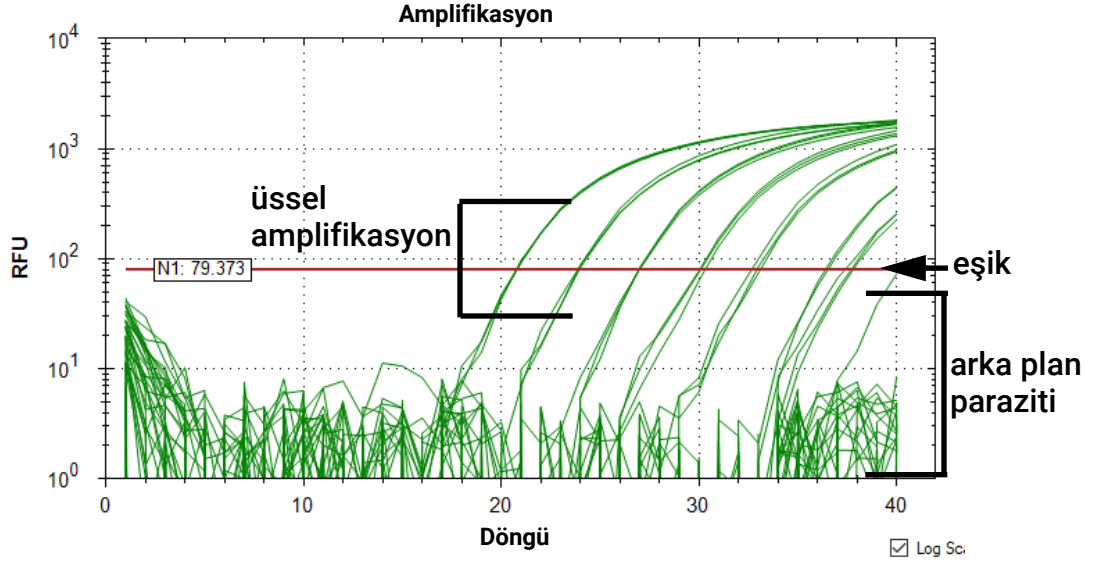


Şekil 34 Log ölçeğinde Maestro Amplifikasyon grafiği – hedef eşikler yatay çizgiler olarak gösterilir

- 9 N1 hedefi için amplifikasyon çizimlerini ve varsayılan eşiği görsel olarak değerlendirin.
 - a Amplifikasyon grafiğinin altında, görüntülemek üzere yalnızca FAM (N1) hedefini seçmek için onay kutularını kullanın.

- b Eşiğin hem arka plan parazitinin üstünde olacak kadar yüksek hem de üssel amplifikasyon fazında çizimleri içerecek kadar düşük olup olmadığını belirleyin (bkz. **Şekil 35**). Bu saptama temelinde **Tablo 15**'te yönlendirildiği gibi ilerleyin.

10 Adım 11'i N2 hedefi için ve yine RP hedefi için tekrarlayın.



Şekil 35 N1 hedefi için Maestro Amplifikasyon grafiği

Tablo 15 Design & Analysis yazılımında optimum eşik ayarını doğrulama

Eşik konumu	Açıklama	İşlem
Optimum konum	Arka plan parazitinin üstünde ve üssel amplifikasyon fazında tüm çizimleri içeriyor	Eşikleri mevcut değerlerinde bırakın.
Çok yüksek	Üssel amplifikasyon fazındaki bazı çizimler eşiği geçmez	- Arka plan paraziti istisnai şekilde yüksek olan kuyucuklara bakın. Bunun gibi aykırı kuyucuklar yazılımın eşiği çok yükseğe ayarlamasına neden olabilir. - Plate Editor'ı açmak için Plate Setup > View/Edit Plate öğelerine tıklayın. - Plaka haritasında aykırı kuyucuğu seçin. - Plate Editor'ın sağ tarafındaki panelde Exclude Wells in Analysis etiketli onay kutusunu işaretleyin (panelin alt kısmında bulunur). OK öğesine tıklayın. Değişiklikleri uygulamak isteyip istemediğiniz sorulduğunda, Yes öğesine tıklayın. Aykırı kuyucuk dışarıda bırakıldığında yazılım eşiği tekrar hesaplar. Alternatif olarak, grafikte eşik çizgisini yeni bir konuma manuel olarak sürüklemek için fareyi kullanın. - Amplifikasyon grafiğinin sağ tarafında, Baseline Threshold iletişim kutusunu açmak için Baseline Threshold simgesine tıklayın. Single Threshold altında, seçimi Auto Calculated iken User Defined olarak değiştirin. (Böylelikle, aykırı kuyucuk tekrar dahil edildiğinde yazılımın eşiği yeniden hesaplaması engellenir.) İletişim kutusunu kapatmak için OK öğesine tıklayın. - Plate Editor'ı yeniden açmak için Plate Setup > View/Edit Plate öğelerine tıklayın. Aykırı kuyucuğu seçin ve Exclude Wells in Analysis onay kutusunu temizleyin. OK öğesine ve ardından Yes öğesine tıklayın. - Amplifikasyon grafiğinin altındaki plaka haritasında, aykırı kuyucuğu analize tekrar dahil etmek için tüm kuyucukları seçin.* * Aykırı kuyucuk için amplifikasyon çizimi, herhangi bir döngü numarasında üssel amplifikasyon göstermiyorsa, düşürülen eşiğin yazılımın kuyucuğa bir Cq değeri atamasına neden olmadığından emin olun (arka plan sinyal parazitinin eşiği geçmesi nedeniyle). Neden oluyorsa, o kuyucuk için diğer analiz ayarlarını değiştirmeyi deneyin, ör. Başlangıç Başlama ve/veya Başlangıç Bitiş döngü sayılarını ayarlayın.
Çok düşük	Bazı çizimler arka plan parazitinin üstünde olmaz.	Eşiği, arka plan parazit seviyesinin hemen üstüne yükseltin.

Adım 3. NTC kuyucuğunda sonuçları doğrulama

11 Sonuçların görüntülediği tabloda, kuyucuk A12'de bulunan Şablonsuz Kontrol (NTC) reaksiyonunu bulun.

12 Üç hedef için de Cq sütununda "N/A" olduğundan ya da Cq değerinin >37,00 olduğundan emin olun.

Herhangi bir hedef için NTC reaksiyonunda Cq değeri $\leq 37,00$ ise, örnek kontaminasyonu meydana gelmiş olabilir. Çalıştırmayı geçersiz kılın ve kılavuzlara kati şekilde uyarak analizi tekrar edin.

CFX Maestro yazılımından verileri dışa aktarma

- 1 Data Analysis penceresinin üst kısmında **Export > Custom Export** öğelerine tıklayın.
Custom Export iletişim kutusu açılır.
- 2 Export Format alanında, dışa aktarılan veriler için bir dosya türü seçin, ör. **Excel 2007 (*.xlsx)**.
Bilgisayarınızda, seçili dosya türünü açmak için gerekli yazılımın olduğundan emin olun.
- 3 İletişim kutusunda, onay kutularını **Şekil 36**'da sunulduğu gibi işaretleyin. Exported Columns bölümünü inceleyerek, **Well**, **Target Name**, **Sample Name** ve **Cq** öğelerinin listelendiğinden emin olun.

Custom Export

Export Format: Excel 2007 (*.xlsx) v

Data to Export

☒ Include Run Information Header

Sample Description

☒ Well
☐ Fluorophore
☒ Target Name
☐ Content
☐ Replicate Number
☒ Sample Name
☐ Biological Group Name
☐ Well Note

Quantification

☒ Cq
☐ Starting Quantity
☐ Cq Mean
☐ Cq Standard Deviation
☐ Quantity Standard Deviation

Melt Curve

☐ Melt Temperature
☐ Melt Peak Height
☐ Melt Peak Begin Temperature
☐ Melt Peak End Temperature

End Point

☐ End Point Call
☐ End RFU

Exported Columns

Well
Target Name
Sample Name
Cq

Customize Column Names...

Set as Default Configuration

Export

Close

Şekil 36 CFX Maestro uygulaması için özel veri dışa aktarma ayarları

4 Export öğesine tıklayın.

Save As iletişim kutusu açılır.

5 Dosya için bir klasör seçin.

6 File name alanına dosya için bir ad yazın ya da varsayılanı kullanın.

7 Save öğesine tıklayın.

İletişim kutusu kapanır ve program verileri seçili dosya türü olarak dışa aktarır ve belirlenmiş klasöre kaydeder.

8 Sonuçları yorumlamak için, dosyayı açın ve test örnekleri ile kontrollerin her birinde Cq verilerini inceleyin. Bkz. **Bölüm 6**, “Analiz ve Sonuçlar.”

6

Analiz ve Sonuçlar

Sonuçların Yorumlanması **68**

Bu bölümde, qRT-PCR verileri temelinde analiz sonuçlarının yorumlanmasıyla ilgili bilgiler yer almaktadır.

Sonuçların Yorumlanması

Kontrol örnekleri için sonuçlar ve yorumlama

Herhangi bir kontrol, **Tablo 16**'da açıklandığı gibi beklenen performansı göstermiyorsa, analiz yanlış ayarlanmış veya yürütülmüş olabilir ya da bir reaktif veya ekipman arızası meydana gelmiş olabilir. Böyle bir durumda, çalıştırmayı geçersiz kılın ve analizi tekrarlayın.

Şablonsuz Kontrol (NTC)

NTC, RNA yerine qRT-PCR reaksiyonunda nükleaz içermeyen su kullanılmasından oluşur. NTC reaksiyonu, üç hedefin herhangi biri için 37,00 döngü içinde eşik çizgisini geçen floresan büyüme eğrileri göstermemelidir. NTC reaksiyonu, Cq değeri $\leq 37,00$ olan bir büyüme eğrisi gösterirse, örnek kontaminasyonu meydana gelmiş olabilir. Çalıştırmayı geçersiz kılın ve kılavuzlara kati şekilde uyararak analizi tekrar edin.

SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx için qRT-PCR reaksiyonu, Cq değeri 37,00 veya daha düşük olan 2019-nCoV_N1 ve 2019-nCoV_N2 hedefleriyle pozitif bir sonuç verirken, insan RNaz p gen hedefiyle negatif bir sonuç (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$ olarak rapor edilir) verecektir.

İnsan Numune Kontrolü

İnsan Numune Kontrolü, enfeksiyöz olmayan insan hücrelerinden oluşur ve başarılı RNA ekstraksiyonu ve ekstraksiyon reaktifi bütünlüğü ortaya koymak üzere RNA ekstraksiyonu prosedürü kontrolü olarak kullanılır. İnsan Numune Kontrolünden ekstrakte edilen RNA için qRT-PCR reaksiyonu, Cq değeri 37,00 veya daha düşük olan RP hedefiyle pozitif bir sonuç vermelidir. N1 ve N2 SARS-CoV-2 hedefleri, negatif sonuçlar vermelidir (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$ olarak rapor edilir).

Tablo 16 Kontrollerin Beklenen Performansı

Kontrol türü	Kontrol adı	İzlemek için kullanılır	N1 hedef sonucu	N2 hedef sonucu	RP hedef sonucu
Pozitif	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Primer ve prob bütünlüğü de dahil olmak üzere önemli reaktif hatası	Pozitif (Cq $\leq 37,00$)	Pozitif (Cq $\leq 37,00$)	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$)
Negatif	NTC	Reaktif ve/veya çevresel kontaminasyon	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$)	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$)	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$)
Ekstraksiyon	İnsan Numune Kontrolü	Lizis ve ekstraksiyon prosedüründe hata, ekstraksiyon esnasında olası kontaminasyon	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$)	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da Cq $>37,00$)	Pozitif (Cq $\leq 37,00$)

Klinik örnekler için sonuçlar ve yorumlama

Tablo 17'de, analiz için beklenen sonuçlar listelenmektedir. Bir laboratuvar, analiz kontrolleri için beklenmedik sonuçlar alırsa veya kesin olmayan ya da geçersiz sonuçlar alırsa ve önerilen tekrar test yapılarak çözümlenemiyorsa, danışmanlık almak ve olası numune sevki için lütfen CDC ile irtibat kurun.

İnsan RNaz P geni (RP) hedefi

Tüm klinik örnekler, 37,00 döngü içinde ($Cq \leq 37,00$) eşik çizgisini geçen RP hedefi için floresan büyüme eğrileri göstermelidir, böylelikle insan RNaz P geninin varlığını işaret etmelidir. Herhangi bir klinik örnekte RP hedefinin tespit edilememesi aşağıdakileri gösterebilir:

- Nükleik asidin klinik materyallerden yanlış ekstrakte edilmesiyle, RNA kaybı ve/veya RNA bozulması ya da inhibitör maddelerin taşınmasına yol açılması.
- Yetersiz alım ya da numune bütünlük kaybı nedeniyle yeterli insan hücresel materyali olmaması.
- Yanlış analiz ayarı ve yürütmesi.
- Reaktif veya ekipman arızası.

RP analizi, insan klinik numuneleri için pozitif bir sonuç üretmezse, aşağıdaki gibi yorumlayın:

- Pozitif RP yokken dahi N1 ve N2 hedefleri pozitifse ($Cq \leq 37,00$), sonuç geçerli kabul edilmelidir. Özellikle yüksek viral yükü olan numunelerde, başlangıçtaki klinik örnekte düşük hücre sayıları olması nedeniyle veya viral hedeflerin RP amplifikasyon etkinliğini azaltması nedeniyle bazı örnekler RNaz P büyüme eğrileri gösteremeyebilir. Negatif RP sinyali, klinik numunede SARS-CoV-2 virüsü RNA'sının varlığını dışlamaz.
- RP hedefi negatifse (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$), N1 ve N2 hedeflerinin biri ya da her ikisi negatifse (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$), sonuç numune için geçersiz kabul edilmelidir. Numune kalıntısı varsa, ekstraksiyon prosedürünü ve testi tekrarlayın. Yeniden testten sonra tüm hedefler negatif kalırsa, sonuçları geçersiz olarak rapor edin ve mümkünse yeni bir numune toplanmalıdır.

2019-nCoV_N1 ve 2019-nCoV_N2 hedefleri

- Tüm kontroller beklenen performansı gösterdiğinde, aşağıdaki koşul karşılanırsa bir numune SARS-CoV-2 için **pozitif** kabul edilir.
 - Hem N1 hem de N2 hedefleri için büyüme eğrileri, 37,00 döngü içinde ($Cq \leq 37,00$) eşik çizgisini geçer. RP hedefi pozitif olabilir veya olmayabilir (yukarıdaki açıklamaya bakın) ancak SARS-CoV-2 sonucu hala geçerlidir.
- Tüm kontroller beklenen performansı gösterdiğinde, aşağıdaki koşulların HER İKİSİ karşılanırsa bir numune SARS-CoV-2 için **negatif** kabul edilmelidir.
 - N1 ve N2 hedefleri için büyüme eğrileri, 37,00 döngü içinde (Cq tespit edilmedi veya $Cq > 37,00$) eşik çizgisini GEÇMEZ.
 - RP hedefi için büyüme eğrisi, 37,00 döngü içinde ($Cq \leq 37,00$) eşik çizgisini GEÇER.
- Tüm kontroller beklenen performansı gösterdiğinde, aşağıdaki koşulların HERHANGİ BİRİ karşılanırsa bir numunenin SARS-CoV-2 için **kesin olmadığı** kabul edilir.
 - 2019-nCoV hedeflerinin biri için büyüme eğrisi 37,00 döngü içinde ($Cq \leq 37,00$) eşik çizgisini geçerken, diğer 2019-nCoV hedefi için büyüme eğrisi 37,00 döngü içinde eşik çizgisini geçmez (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$). RP hedefi için büyüme eğrisi, 37,00 döngü içinde ($Cq \leq 37,00$) eşik çizgisini geçer.

Kesin olmayan numuneler için, numuneden ekstrakte edilen RNA tekrar test edilmelidir. RNA kalıntısı yoksa, kalan numuneden tekrar RNA ekstrakte edin ve tekrar test edin. Aynı sonuç alınırsa, kesin olmayan sonucu rapor edin.

- İnsan Numune Kontrolü N1 ya da N2 için pozitifse ($Cq \leq 37,00$), ekstraksiyon veya örnek işleme esnasında kontaminasyon meydana gelmiş olabilir. İnsan Numune Kontrolüyle birlikte ekstrakte edilen numuneler için tüm sonuçları geçersiz yapın. Numuneleri ve İnsan Numune Kontrolünü tekrar ekstrakte edin ve yeniden test edin.

Tablo 17 SARS-CoV-2 qRT-PCR analizi için beklenen sonuçlar

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	İnsan RNaz P geni	Sonuç yorumlama*	Rapor	İşlemler
Pozitif ($Cq \leq 37,00$)	Pozitif ($Cq \leq 37,00$)	Pozitif VEYA Negatif	SARS-CoV-2 tespit edildi	Pozitif SARS-CoV-2	Sonuçları CDC'ye ve gönderene rapor edin
Negatif (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$)	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$)	Pozitif ($Cq \leq 37,00$)	SARS-CoV-2 tespit edilmedi	Tespit edilmedi	Sonuçları, gönderene rapor edin. Diğer solunum virüsleri için test yapmayı göz önünde bulundurun. [†]
Pozitif ($Cq \leq 37,00$)	Negatif (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$)	Pozitif ($Cq \leq 37,00$)	Kesin olmayan sonuç	Kesin değil	Ekstrakte edilmiş örneği tekrar test edin ve/veya ekstraksiyonu ve qRT-PCR'ı tekrarlayın.
Negatif (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$)	Pozitif ($Cq \leq 37,00$)	Pozitif ($Cq \leq 37,00$)	Kesin olmayan sonuç	Kesin değil	Ekstrakte edilmiş örneği tekrar test edin ve/veya ekstraksiyonu ve qRT-PCR'ı tekrarlayın.
2019-nCoV hedeflerinin biri veya daha fazlası negatifse (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$)		Negatif (Cq tespit edilmedi ya da $Cq > 37,00$)	Geçersiz sonuç	Geçersiz	Ekstraksiyonu ve qRT-PCR'ı tekrarlayın. Tekrar edilen sonuç geçersiz kalırsa, hastadan yeni bir numune almayı göz önünde bulundurun.

* Laboratuvarlar, tanı sonuçlarını uygun olduğu şekilde ve spesifik raporlama sistemlerine uygun şekilde rapor etmelidir.

[†] Optimum numune tipleri ve 2019-nCoV nedeniyle oluşan enfeksiyonlar esnasında pik viral seviyeler için zamanlama belirlenmemiştir. Virüsün tespit edilmesi için, aynı hastadan birden fazla numune alınması gerekebilir. Hastanın yeni maruziyetlerinde veya klinik görünümünde 2019-nCoV enfeksiyonu olasılığı işaret ediliyorsa ve diğer hastalık nedenleri (ör. diğer solunum hastalığı) için tanı testleri negatifse, yanlış negatif sonuç olasılığı özellikle dikkate alınmalıdır. 2019-nCoV enfeksiyonu şüphesi hala varsa, kamu sağlığı yetkililerine danışılarak yeniden test yapılması göz önünde bulundurulmalıdır.

7

Kalite Kontrol

Kalite Kontrol 72

Bu bölümde, analize yönelik kalite kontrol önlemleriyle ilgili bilgiler yer almaktadır.

Kalite Kontrol

- Kalite kontrol gereklilikleri, yerel düzenlemeler ve devlet düzenlemelerine ya da akreditasyon gerekliliklerine ve kullanıcı laboratuvarının standart kalite kontrol prosedürlerine uygun şekilde gerçekleştirilmelidir.
- Kalite kontrol prosedürleri, reaktif ve analiz performansının izlenmesi için tasarlanmıştır.
- Her yeni kit lotuyla tanı örnekleri çalıştırmadan önce, tüm reaktiflerin ve kit bileşenlerinin düzgün çalıştığından emin olmak üzere tüm pozitif kontrolleri test edin.
- İyi laboratuvar uygulamasında (cGLP), her bir nükleik asit izolasyon serisine pozitif bir ekstraksiyon kontrolü dahil edilmesi önerilmektedir.
- İnsan Numune Kontrolü, test edilecek her numune serisiyle nükleik asit ekstraksiyonuna **ilerlemelidir**.
- Her amplifikasyon ve tespit çalışmasına **daima**, şablonsuz kontrol (NTC) ve SARS-CoV-2 Sentetik Pozitif RNA Kontrolü dahil edin.
- İnsan RNaz P geni için prob/primer seti (10× SARS-CoV-2 Primer/Prob Karışımına dahil) numune kalitesi ve ekstraksiyonunu kontrol eder.

8

Analizin Kısıtlamaları

Kısıtlamalar **74**

Bu bölümde, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ile yapılan analizin kısıtlamaları açıklanmaktadır

Kısıtlamalar

- 1 Bu analizin kullanımı, prosedürde eğitimli personelle sınırlıdır. Bu talimatlara uyulmaması halinde hatalı sonuçlar oluşabilir.
- 2 Güvenilir sonuçlar elde edilmesi, numunelerin uygun şekilde alınmasına, taşınmasına, saklanmasına ve işlenmesine bağlıdır.
- 3 İyi laboratuvar uygulamalarına ve bu kullanma talimatlarında belirtilen prosedürlere uyarak kontaminasyon oluşmasını önleyin.
- 4 Negatif sonuçlar, SARS-CoV-2 enfeksiyonlarını dışlamaz ve tedavi ya da diğer yönetim kararları için yegane temel olarak kullanılmamalıdır.
- 5 Pozitif sonuç, ilgili virüsten nükleik asit tespitini işaret eder. Nükleik asit, virüs canlı olmadıktan sonra dahi kalıcı olabilir.
- 6 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit analizinin performansı, UTM veya VCM taşıma ortamında alınan nazofaringeal svab numune tipi kullanılarak belirlenmiştir. Orofaringeal svablar, nazal svablar ve orta türbinat nazal svabları, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit analiziyle kullanıma yönelik uygun numune tipleri olarak kabul edilir ancak bu numune tipleriyle performans belirlenmemiştir. Orofaringeal svablar, nazal svablar ve orta türbinat nazal svabların (bir sağlık uzmanının gözetiminde kendi kendine alınan ya da sağlık uzmanı tarafından alınan) testleri, COVID-19 semptomları olan hastalarla sınırlıdır.
- 7 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, İnsan Numune Kontrolü olarak kullanıma yönelik bir örnek içermez. Bu kontrol olarak kullanılan örnek, laboratuvar tarafından doğrulanmalıdır.

9

Performans Özellikleri

Performans Özellikleri **76**

Bu bölümde, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürününün performans özellikleri yer almaktadır.

Performans Özellikleri

Aşağıdaki veriler, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürününün performans özelliklerini ortaya koymaktadır. Tüm örnek ekstraksiyonları, **sayfa 19'da "Nükleik Asit Ekstraksiyonu"** kısmında önerilen numune giriş hacimlerini ve elüsyon hacimlerini kullanmıştır.

Analitik Hassasiyet (Tespit Sınırı)

Agilent, desteklenen üç adet gerçek zamanlı PCR sisteminin her birinde ve desteklenen nükleik asit ekstraksiyon prosedürlerinin her biriyle en azından %95 oranında Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit tarafından tespit edilebilen en düşük SARS-CoV-2 viral konsantrasyonunu (viral genom kopyası sayısı olarak ifade edilir) belirlemek amacıyla bir Tespit Sınırı (LoD) çalışması gerçekleştirmiştir.

İstenen SARS-CoV-2 hedef konsantrasyonu serisini elde etmek amacıyla LoD test örnek panelleri SARS-CoV-2 standardı, birleştirilmiş negatif klinik numunelerle (negatif matris) seyretilerek oluşturulmuştur. Tüm klinik numuneler, Acil Durumda Kullanım Onayı olan ve Agilent tarafından ilaveten onaylanmış bir SARS-CoV-2 testi kullanılarak satıcı tarafından daha önce SARS-CoV-2 için test edilmiş nazofaringeal svablar olmuştur.

İki adet ön tam analiz LoD deneyinde, konsantrasyon başına üç kopyayla bir viral konsantrasyon aralığı kullanılmıştır. Ön deneyde, 0,75 ila 3 kopya/μl aralığında test edilen konsantrasyonlarda konsantrasyon aralığı. Ön deneyin sonuçları, nihai LoD'un muhtemelen bu aralıkta düşeceğini ve ekstraksiyon yöntemine ve gerçek zamanlı PCR sistemine bağlı olarak değişeceğini göstermiştir.

Nihai tam analiz LoD onay deneyi, üç hedef giriş seviyesinde yürütülmüştür: 0,75, 1 ve 1,5 kopya/μl. Üç hedef giriş seviyesinin her birinde, olası tüm ekstraksiyon yöntemi/gerçek zamanlı PCR sistemi kombinasyonlarında 20 tekil ekstraksiyon kopyası test edilmiştir. **Tablo 18'de**, o deneydeki pozitif tespit oranları sunulmaktadır. 20/20 tespit oranı, 20 ekstraksiyon kopyasının hepsinin, ekstraksiyon yöntemi ve gerçek zamanlı PCR sisteminin o kombinasyonu ile tespit edilebildiğini göstermektedir.

Tablo 18 Nihai Tespit Limiti Onayı — Her bir gerçek zamanlı PCR sisteminde (Agilent AriaMx, ABI 7500 ve Bio-Rad CFX96) her bir nükleik asit ekstraksiyon yöntemiyle pozitif tespit oranları*

Ekstraksiyon öncesinde SARS-CoV-2 viral hedef giriş seviyesi (kopya/μl)	QIA Symphony ile QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (otomatik ekstraksiyon)			KingFisher Flex ile MagMAX Viral/Pathogen II Nükleik Asit İzolasyon Kiti (otomatik ekstraksiyon)		
	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
1,5	19/19 (1)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1	1/10 (10)	20/20	17/18 (2)	19/19 (1)	18/19 (1)	18/18 (2)
0,75	3/13 (7)	15/16 (4)	18/18 (2)	15/16 (4)	19/19 (1)	16/16 (4)

* Tespit oranları, toplam pozitif ve negatif kopya sayısı arasındaki pozitif kopya sayısı olarak ifade edilir. Mevcut olduğunda parantez içindeki sayılar, kesin olmayan kopya sayısını belirtir. Bu durumlarda toplam pozitif ve negatif kopya sayısı 20'den azdır.

Tablo 19'da, her bir ekstraksiyon yöntemi/gerçek zamanlı PCR sistemi kombinasyonu için nihai LoD değerleri özetlenmektedir. Bu değerler, en azından %95 oranda Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit tarafından tespit edilebilecek olan, µl nükleik asit ekstraktı başına viral kopya sayısını temsil etmektedir.

Tablo 19 Nihai Tespit Sınırı Özeti — Her bir gerçek zamanlı PCR sisteminde (Agilent AriaMx, ABI 7500 ve Bio-Rad CFX96) her bir nükleik asit ekstraksiyon yöntemi için LoD

Nükleik asit ekstraksiyon yöntemi	Bütün Analizin Tespit Sınırı (kopya/µl)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIAasymphony ile QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (otomatik ekstraksiyon)	1,5	1	1,5
KingFisher Flex ile MagMAX Viral/Pathogen II Nükleik Asit İzolasyon Kiti (otomatik ekstraksiyon)	1	1,5	1,5

Analitik Kapsayıcılık

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürününde, insan RNaz P geni ve N1 ile N2 viral hedefleri için oligonükleotid primer ve prob dizileri, CDC 2019-Yeni Koronavirüs (2019-nCoV) Yalnızca Acil Durumda Kullanıma Yönelik Gerçek Zamanlı RT-PCR Tanı Panelinde kullanılan diziyle aynıdır. Bu panelin kapsayıcılığı daha önce belirlenmiştir.

Çapraz Reaktivite

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürününde, insan RNaz P geni ve N1 ile N2 viral hedefleri için oligonükleotid primer ve prob dizileri, CDC 2019-Yeni Koronavirüs (2019-nCoV) Yalnızca Acil Durumda Kullanıma Yönelik Gerçek Zamanlı RT-PCR Tanı Panelinde kullanılan diziyle aynıdır. Bu panelin çapraz reaktivitesi daha önce belirlenmiştir.

Klinik Değerlendirme

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürünüyle, insan nazofaringeal svab (NP) numuneleri kullanılarak bir klinik değerlendirme çalışması yapılmıştır. Her test koşulu için toplam 80 numune test edilmiştir: 40 negatif NP numunesi ve 40 pozitif NP numunesi. Her numune için pozitif veya negatif durumu, SARS-CoV-2'ye yönelik Acil Durumda Kullanım Onaylı (EUA) qRT-PCR analiziyle onaylanmıştır. Klinik değerlendirmenin hedefi, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürünüyle elde edilen test sonuçlarının, SARS-CoV-2'ye yönelik karşılaştırmalı EUA qRT-PCR analizinde elde edilen sonuçlarla klinik uyumunun (pozitif/negatif) değerlendirilmesi olmuştur.

Bu Kullanma Talimatlarında sağlanan tavsiyeler ve üreticinin protokolü kullanılarak, desteklenen otomatik ekstraksiyon platformlarının her ikisiyle (QIAasymphony SP ile QIAGEN QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit ve KingFisher Flex Saflaştırma Sistemi ile Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nükleik Asit İzolasyon Kiti) her numune üzerinde nükleik asit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen her örnek ardından, bu Kullanma Talimatlarında açıklandığı gibi, desteklenen gerçek zamanlı PCR sistemlerinin üçünde de (Agilent AriaMx, ABI 7500 ve Bio-Rad CFX96) test edilmiştir. Böylelikle her numune, bu

çalışmadaki altı (6) farklı koşulda test edilmiştir. Kabul kriterleri olarak, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ve karşılaştırmalı analiz arasında en az %95 pozitif ve negatif uyum gerekli olmuştur. Uyumla ilgili sonuçlar **Tablo 20**'de özetlenmektedir.

Tablo 20 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ve SARS-CoV-2'ye yönelik karşılaştırmalı EUA qRT-PCR analizi arasındaki pozitif yüzde uyumu (PPA), negatif yüzde uyumu (NPA) ve genel uyum (OA)

Ekstraksiyon platformu:	QIAAsymphony	QIAAsymphony	QIAAsymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Gerçek zamanlı PCR sistemi:	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
PPA	%97,4	%100,0	%100,0	%97,5	%97,5	%97,5
NPA	%100,0	%97,5	%100,0	%97,5	%97,5	%97,5
OA	%98,7	%98,8	%100,0	%97,5	%97,5	%97,5

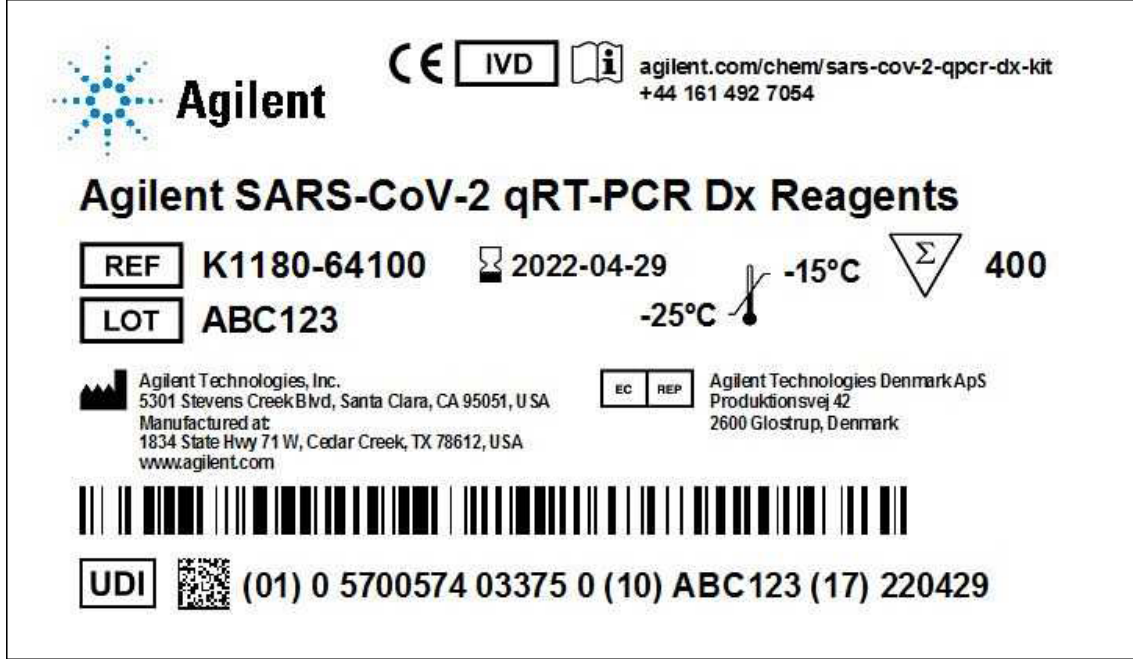
10

Referans

Ürün Etiketleri **80**

Bu bölümde, Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ürünü için ürün etiketlerinin kopyaları yer almaktadır.

Ürün Etiketleri



 **Agilent**    [agilent.com/chem/sars-cov-2-qpcr-dx-kit](https://www.agilent.com/chem/sars-cov-2-qpcr-dx-kit)
+44 161 492 7054

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents

REF K1180-64100  2022-04-29  -15°C  400

LOT ABC123  -25°C

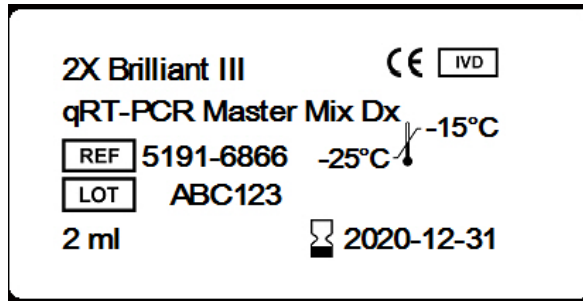
 Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, U.S.A.
Manufactured at:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, U.S.A.
www.agilent.com

  Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark



UDI  (01) 0 5700574 03375 0 (10) ABC123 (17) 220429

Şekil 37 K1180-64100 için kutu etiketi



2X Brilliant III  

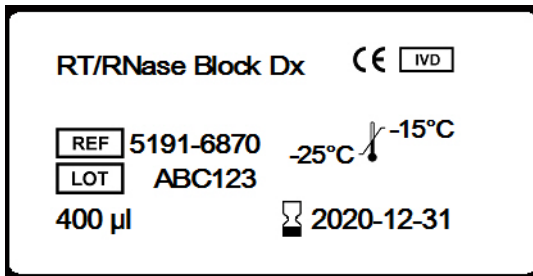
qRT-PCR Master Mix Dx  -15°C

REF 5191-6866  -25°C

LOT ABC123

2 ml  2020-12-31

Şekil 38 5191-6866 için şişe etiketi



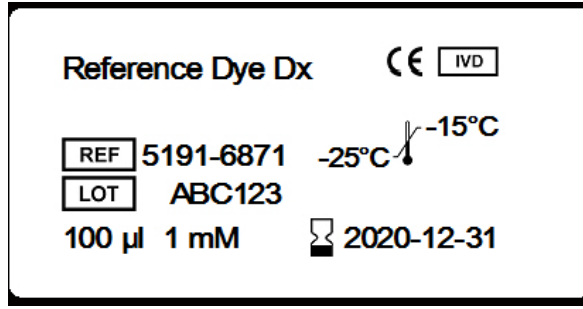
RT/RNase Block Dx  

REF 5191-6870  -15°C

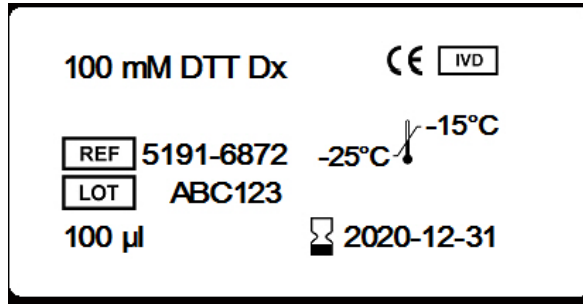
LOT ABC123  -25°C

400 µl  2020-12-31

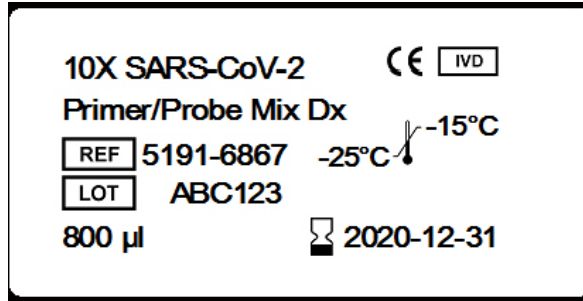
Şekil 39 5191-6870 için tüp etiketi



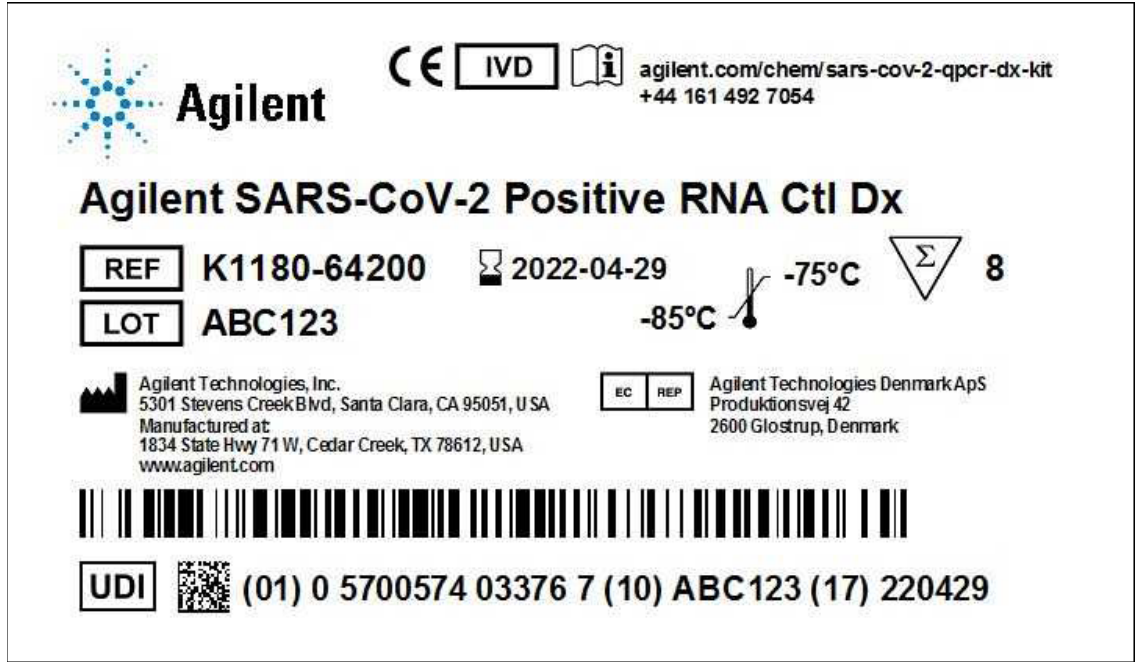
Şekil 40 5191-6871 için tüp etiketi



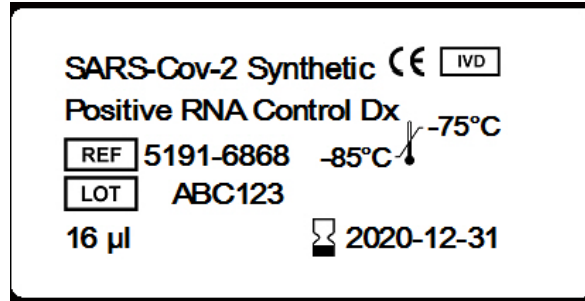
Şekil 41 5191-6872 için tüp etiketi



Şekil 42 5191-6867 için tüp etiketi



Şekil 43 K1180-64200 için kutu etiketi



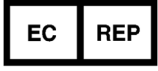
Şekil 44 5191-6868 için tüp etiketi

Üretici



Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
Üretimin yapıldığı yer:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com

Avrupa Birliği Yetkili Temsilcisi



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark

Agilent Teknik Destek

Ülkelere göre telefon numaralarını bulmak için www.agilent.com/en/contact-us/page adresini ziyaret edin veya covid.support@agilent.com adresine e-posta gönderin

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ve uluslararası telif hakları yasalarınca yönetildiği şekilde, Agilent Technologies, Inc. firmasıyla önceden mutabakat sağlanmadan ve yazılı onay alınmadan, bu kılavuzun hiçbir bölümü herhangi bir biçimde veya herhangi bir yöntemle (elektronik depolama ve alım ya da yabancı dile tercüme dahil) yeniden üretilmez.

