T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RSV, INFLUENZA VE SARS-COV-2 İÇİN MULTİPLEKS RT-PCR TESTİ VALİDASYONU

Alihan BULGURCU
ORCID: 0000-0001-7422-4494

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mikrobiyoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR
ARALIK 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2016970069

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RSV, INFLUENZA VE SARS-COV-2 İÇİN MULTİPLEKS RT-PCR TESTİ VALİDASYONU

Alihan BULGURCU
ORCID: 0000-0001-7422-4494

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mikrobiyoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER
ORCID: 0000-0001-6750-2353

İZMİR
ARALIK 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2016970069

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum 'RSV, INFLUENZA VE SARS-COV-2 İÇİN MULTİPLEKS RT-PCR TESTİ VALİDASYONU' başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yaralandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Alihan BULGURCU

20/11/2024

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ iii
GRAFİKLER DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vii
TEŞEKKÜR x
ÖZET xi
ABSTRACT xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Moleküler Tanı 3
2.2. Dijital PCR 5
2.3. Dijital PCR'ın Uygulama Alanları 6
2.3.1. Dijital PCR Sonuçlarının Analizi 8
2.4. Multipleks Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi 11
2.4.1. Solunum Yolu Patojenleri Tanısında Multipleks PCR 12
2.5. Validasyon 15
2.5.1. Validasyon Planı 18
3. GEREÇ ve YÖNTEM 28
3.1. Araştırmanın Tipi 28
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı 28
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi 28
3.4. Çalışma Materyali 29
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 29
3.6. Veri Toplama Araçları 30
3.6.1.Influenza A, influenza B ve RSV için dijital PCR ile Kantitatif Materyal Eldesi 30
3.6.1. Diagnovital qRT-PCR Test Validasyonu 35
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi 40
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları 41
3.9. Etik Kurul Onayı 41

4. BULGULAR 42
4.1. Dijital PCR Bulguları 42
4.1.1. Dijital PCR Validasyon Bulguları 44
4.1.2. Dijital PCR ile QRT-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması 49
4.2. qRT-PCR Validasyon Bulguları 52
4.2.1. Analitik Duyarlılık (LoD) 52
4.2.2. Analitik Özgüllük 61
4.2.3. Kesinlik 61
4.2.4. Doğruluk 63
5. TARTIŞMA 69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 74
7. KAYNAKLAR 75
8. EKLER 86
8.1. Uygulama İzni 86
8.2. Etik Kurul Onayı 89

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Rutinde kullanılan bazı multipleks solunum yolu patojen nükleik asit tanı testleri 14

Tablo 2. Araştırmanın Plan Çizelgesi 28

Tablo 3. Dijital PCR yönteminde kullanılan reaktifler 32

Tablo 4. Dijital PCR sisteminin çalışma basamakları 32

Tablo 5. RSV için validasyon örneklerinin hazırlanması 33

Tablo 6. Influenza B için validasyon örneklerinin hazırlanması 33

Tablo 7. Influenza A için validasyon örneklerinin hazırlanması 33

Tablo 8. Diagnovital kitinde kullanılan primer ve prob dizileri 36

Tablo 9. PCR'dan elde edilen Ct sonuçları için şablon kayıt formu 36

Tablo 10. Probit regresyon analizinde kullanılan konsantrasyonlar 37

Tablo 11. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar 39

Tablo 12. Dijital PCR ile kantite edilen örnekler ve elde edilen konsantrasyon değerleri 42

Tablo 13. Influenza A, influenza B ve RSV için dPCR LoD ve LoQ değerleri 48

Tablo 14. İnfluenza A, influenza B ve RSV örnekleri için dPCR çalışmalar arası %CV 48

Tablo 15. Farklı konsantrasyonlarda influenza A, influenza B ve RSV için dPCR çalışma içi %CV 49

Tablo 16. İnfluenza A, influenza B ve RSV örneklerinin dPCR konsantrasyon sonuçları ile qRT-PCR Ct değerlerinin karşılaştırması 49

Tablo 17. SARS-CoV-2, Influenza A, influenza B ve RSV konsantrasyon ve pozitiflik verilerinin normallik test sonuçları 53

Tablo 18. SARS CoV-2 Alfa LoD Probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları 53

Tablo 19. SPSS Probit analizi ile Diagnovital kitinin SARS-CoV-2 Alfa için LoD sonuçları 53

Tablo 20. SARS CoV-2 Alfa LoD Probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları 55

Tablo 21. SPSS Probit analizi ile Diagnovital kitinin SARS-CoV-2 Omicron için LoD sonuçları 55

Tablo 22. RSV LoD probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları 56

Tablo 23. SPSS probit analizi ile Diagnovital kitinin RSV için LoD sonuçları 56

Tablo 24. Influenza A LoD probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları 57

Tablo 25. SPSS probit analizi ile Diagnovital kitinin Influenza A için LoD sonuçları 58

Tablo 26. Influenza B LoD probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları 59

Tablo 27. SPSS probit analizi ile Diagnovital kitinin Influenza B için LoD sonuçları 59

Tablo 28. Diagnovital RT-PCR kitinin SARS-CoV-2 Alfa, Influenza A, Influenza B ve RSV için çalışma içi ve çalışmalar arası tekrarlanabilirlik sonuçları..... 61

Tablo 29. Virüslerin singleplex ve multipleks kombinasyon çalışmasındaki Ct değerleri..... 63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. RSV çalışmasında 2 µl ve 4 µl template RNA hacmi için RSV dağılım grafiği 44

Şekil 2. Log10 10^1 ile 10^7 kopya/mL arasındaki nükleik asit konsantrasyonları için Ct değerlerini gösteren genel standart eğri. Eğim çizgisi için logaritmik denklem ve R^2 değerleri gösterilmektedir. A: SARS-CoV-2 Alfa, B: SARS-CoV-2 Omicron, C: Influenza A, D: Influenza B, E: RSV..... 61

Şekil 3. QCMD 2022 solunum dış kalite kontrol paneli (RESPI22C1, RESPII22C1, RESPIII22C1) panel içeriği 63

Şekil 4. Test edilen virüse göre Diagnovital testi ve karşılaştırma testi ile elde edilen Ct değerleri. A: SARS-CoV-2, B: Influenza A, C: Influenza B, D: RSV 65

Şekil 5. Diagnovital kiti ve karşılaştırma kiti ile SARS-CoV-2, influenza a, influenza b ve RSV için elde edilen Ct değerlerine ait Bland-Altman grafikleri. 66

Şekil 6. Diagnovital kiti ve karşılaştırma kiti ile SARS-CoV-2, influenza a, influenza b ve RSV için elde edilen Ct değerlerine ait Bland-Altman grafikleri (touchdown döngü farkları çıkarılmış)..... 67

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. RSV için beklenen ve dPCR ile elde edilen değerler arasındaki % fark grafiği 45

Grafik 2. RSV için beklenen ve dPCR ile elde edilen sonuçlar arasındaki lineer regresyon grafiği 45

Grafik 3. Influenza B için beklenen ve dPCR ile elde edilen değerler arasındaki % fark grafiği 46

Grafik 4. Influenza B için beklenen ve dPCR ile elde edilen sonuçlar arasındaki lineer regresyon grafiği 46

Grafik 5. Influenza A için beklenen ve dPCR ile elde edilen değerler arasındaki % fark grafiği 47

Grafik 6. Influenza A için beklenen ve dPCR ile elde edilen sonuçlar arasındaki lineer regresyon grafiği 47

Grafik 7. Influenza B dPCR sonuçları ile qRT-PCR Ct değerleri arasındaki doğrusal regresyon grafiği 50

Grafik 8. RSV dPCR sonuçları ile qRT-PCR Ct değerleri arasındaki doğrusal regresyon grafiği 50

Grafik 9. Influenza A dPCR sonuçları ile qRT-PCR Ct değerleri arasındaki doğrusal regresyon grafiği 51

Grafik 10. dPCR ile qRT-PCR tekrarlanabilirlik (çalışma içi) verilerinin karşılaştırması 52

Grafik 11. dPCR ile qRT-PCR tekrarlanabilirlik (çalışmalar arası) verilerinin karşılaştırması 52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dPCR	Dijital polimeraz zincir tepkimesi
mL	mililitre
dk	Dakika
kb	kilobaz
RNA	Ribonükleik asit
qRT-PCR	Gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi
RSV	Solunum sinsityal virus
SARS-CoV (SC2)	Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü
log	logaritma
CV	Varyasyon katsayısı
NGS	Yeni nesil dizileme
NASBA	Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon
LAMP	Döngüye dayalı izotermal amplifikasyon
DNA	Deoksiribonükleik asit
bDNA	Dallanmış DNA
ddPCR	Damlacıklı dijital PCR
cDNA	Komplementer DNA
s	Saniye
N	Örneklem sayısı

λ	Partisyon başına ortalama kopya sayısı
$Urel$	Göreceli belirsizlik
p	Pozitif bölme sayısı
w	Negatif bölme sayısı
CI	Güven aralığı
µl	Mikro litre
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
CLIA	Amerika Birleşik Devletleri Klinik Laboratuvar İyileştirme Değişiklikleri
IVD	In-vitro tanı
ISO	Uluslararası Standardizasyon Kuruluşu
CE	Avrupa uygunluğu
LDT	Laboratuvarda geliştirilmiş test
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
EC	Ekstraksiyon kontrolü
IC	İnternal kontrol
R^2	Korelasyon katsayısı
LoD	Tespit sınırı
LoQ	Kantitasyon sınırı
SD	Standart sapma

CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
QCMD	Moleküler Tanı için Kalite Kontrol
EQA	Dış kalite kontrol
Ct	Döngü eşiği
Inf A	Influenza A
Inf B	Influenza B

TEŞEKKÜR

Zorlu geçen doktora eğitimim boyunca gerek mesleki gerekse kişisel olarak bana ve çalışmalarıma sağladığı katkı ve desteklerinden ötürü danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sayın SAYINER, doktora sürecimde hep bir adım ileri gitmemi sağlayarak bana mükemmel bir rol model oldu. Kendisine yürekten teşekkürü borç bilirim.

Mikrobiyoloji doktora eğitimimin laboratuvar çalışmaları sırasında birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve her daim desteğini esirgemeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda başta Filiz Alkan olmak üzere tüm çalışan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi bildiriyorum.

Yine tez çalışması sürecimde her türlü desteği gösteren anabilim dalı sekreterimiz Aysun Caner'e ve Şerife Teyzeme ayrıca teşekkür ederim. Yüksek lisanstan beri akademik hayatımda çok büyük katkıları olan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarına da teşekkür ederim.

Benimle aynı süreci paylaşan ve emek vererek çalıştıkları alanlara katkıda bulunan Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora yapan, asistanlık görevlerini sürdüren tüm arkadaşlarıma, birlikte öğrendiğimiz, eğlendiğimiz ve bilimsel aktiviteler düzenlediğimiz süreler boyunca bana sağladıkları motivasyon ve kattıkları farklı bakış açıları için teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve çok değerli Emre Kıran'a sonsuz teşekkür ederim.

Alihan BULGURCU

RSV, INFLUENZA VE SARS-COV-2 İÇİN MULTİPLEKS RT-PCR TESTİ VALİDASYONU

Doktora Tezi

Alihan BULGURCU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Viral solunum yolu hastalıklarının önemli bir yük oluşturması, bu önemli viral patojenlerin hızlı bir şekilde tespit edilip tanımlanmasını gerekli kılmaktadır. İlk adımda üç yaygın patojenin (SARS-CoV-2, RSV, influenza A/B virüsü) eşzamanlı olarak test edilmesi ve gerektiğinde daha geniş bir panelin kullanılması, maliyet etkin bir yaklaşımdır. Bu çalışmanın birincil amacı, SARS-CoV-2, RSV ve influenza A/B virüslerini aynı anda test edebilen yeni bir ticari niteliksel multipleks qRT-PCR testi (Diagnovital® RTA Laboratories, Türkiye) doğrulamaktır.

Nükleik asit testlerinde sentetik nükleik asit veya plazmid yerine tam virüs içeren standartların kullanılması, ekstraksiyon, ters transkripsiyon ve amplifikasyonu içerecek şekilde tanı testinin tüm basamaklarının gerçek yaşam koşullarında değerlendirilmesini sağlar. Solunum yolu virüsleri gibi bazı mikroorganizmalar için, nükleik asit testlerine yönelik ticari kantitatif standart materyalleri sınırlıdır. Bu çalışmanın ikincil amacı; influenza A, influenza B ve RSV için dijital PCR (dPCR) kullanarak kantitatif standartlar geliştirmek ve bunları qRT-PCR test validasyonunda kullanmaktır.

Her virüs için analitik duyarlılık, her virüs için hazırlanan seyreltme serileri (10^5-10^1 kopya/mL) kullanılarak Probit regresyon analizi ile hesaplandı. RSV, influenza A, influenza B RNA pozitif olduğu bilinen nazofarenjiyal sürüntü numunelerinin havuzlanması ile hazırlanan örneklerdeki virüs miktarı, ticari primer/prob setleri (Qiagen, infA-DMA00373, infB-DMA00374, RSV-DMA00379) kullanılarak dPCR (QIAcuity,Qiagen) yöntemi ile belirlendi. dPCR yönteminin influenza A&B ve RSV için analitik duyarlılık (LoD) ve kantitasyon alt sınırı (LoQ), çalışma içi ve çalışmalar arası tekrarlanabilirliği ve doğrusallığı belirlenerek bu viruslar için dPCR yöntemi de valide edildi. qRT-PCR validasyonu için analitik özgüllük, 120 negatif örnek ve diğer solunum yolu virüsleri için pozitif olan 32 örnek ile test edildi. RSV (n = 39), influenza A/B (n = 71), SARS-CoV-2 (n = 64) pozitif klinik örnekleri ve harici kalite kontrol panelleri doğruluk testi için kullanıldı. Tespit sınırına yakın konsantrasyondaki örnekler, iç-dış analizlerde tekrar edilebilirliği değerlendirmek amacıyla üçlü olarak

çalıştırıldı.

Influenza A, influenza B ve RSV için dPCR yönteminin LoD değerleri sırasıyla 93,75; 15,59 ve 15,38 kopya/mL olarak belirlendi. dPCR yönteminin çalışma içi tekrarlanabilirliği, düşük viral yüklü örneklerde daha yüksek olmak üzere 0,06-7,97 arası saptandı. Çalışmalar arası tekrarlanabilirlik 0,73-5,41 arası idi. İnfluenza A ve B için 3-4 log10, RSV için 7 log10 aralığında dilüsyonlar ile yapılan doğrusallık analizinde r2: 0,99 olarak bulundu. Diagnovital® testinin analitik duyarlılığı, SARS-CoV-2 Alfa ve Omikron varyantları, influenza A, influenza B ve RSV için sırasıyla 420.7, 296.7, 368.6, 1362.6, 1459.7 kopya/mL olarak bulunmuştur. Analitik özgüllük %100, CV% ise %5'in altında bulunmuştur. Yeni test, SARS-CoV-2, influenza A, influenza B ve RSV için pozitif örneklerin sırasıyla %100, %95.1, %97.5 ve %94.8'ini doğru şekilde tanımlamıştır.

Sonuç olarak, havuzlanmış hasta örnekleri kullanılarak dPCR yöntemi ile influenza A, influenza B ve RSV için güvenilir kantitatif standartlar elde edildi. Bu standartlar ile ticari bir qRT-PCR testinin LoD ve tekrarlanabilirlik çalışmaları başarıyla gerçekleştirildi. Yeni multipleks qRT-PCR testinin validasyon analizi, testin tanı amaçlı kullanıma uygun olduğunu gösterdi. Düşük virüs düzeyine sahip bazı örneklerde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.

Anahtar Sözcükler: Validasyon, multipleks qRT-PCR, dPCR, Influenza, RSV, SARS-CoV-2

Tezin Sayfa Adedi: 97

Danışman: Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER

VALIDATION OF MULTIPLEX RT-PCR TEST FOR RSV, INFLUENZA, AND SARS-COV-2

Doctorate Thesis

Alihan BULGURCU

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Medical Microbiology

ABSTRACT

The significant burden of viral respiratory diseases requires rapid detection and identification of important viral pathogens. Simultaneous testing for three common pathogens (SARS-CoV-2, RSV, influenza virus A/B) as a first step and using a broader panel as needed is a cost-effective approach. Our objective was to validate a new commercial qualitative multiplex qRT-PCR assay (Diagnovital® RTA Laboratories, Turkey) that can simultaneously test for influenza A/B, RSV and SARS-CoV-2.

Standards containing whole viruses instead of synthetic nucleic acids or plasmids ensures that all steps of the assay being evaluated, including extraction, reverse transcription and PCR, are evaluated as in real life. For some microorganisms, such as respiratory viruses, commercial quantitative standard materials for nucleic acid tests are limited. The secondary aim of this study is to develop quantitative standards for influenza A, influenza B, and RSV using digital PCR (dPCR) and to utilize these standards in the validation of qRT-PCR tests.

Analytical sensitivity for each virus was calculated by Probit regression analysis using dilution series (105-101 copies/mL) prepared for each virus. The amount of virus in the samples prepared by pooling nasopharyngeal swab samples known to be RSV, influenza A, influenza B RNA positive was determined by dPCR (QIAcuity, Qiagen) using commercial primer/probe sets (Qiagen, infA-DMA00373, infB-DMA00374, RSV-DMA00379). The analytical sensitivity (LoD) and lower limit of quantitation (LoQ), intra- and inter-study reproducibility and linearity of the dPCR method for influenza A&B and RSV were determined. Analytical specificity for qRT-PCR validation was tested with 120 negative samples and 32 samples positive for other respiratory viruses. External quality control panels and clinical specimens positive for RSV (n = 39), influenza A/B (n = 71), SARS-CoV-2 (n = 64) were used for accuracy (trueness) testing. Samples at concentrations near the limit of detection were run in triplicate for intra- and inter-assay precision analysis.

LoD values of the dPCR method for influenza A, influenza B and RSV were 93.75 copies/mL, 15.59 copies/mL and 15.38 copies/mL, respectively. The within-run

reproducibility of the dPCR method was determined to be between 0.06 and 7.97, being higher in samples with low viral load. Inter-run reproducibility was between 0.73 and 5.41. In the linearity analysis performed with dilutions between 3-4 log10 for influenza A and B and 7 log10 for RSV, R2 was found to be 0.99. Analytical sensitivity of the Diagnovital® assay was 420.7, 296.7, 368.6, 1362.6, 1459.7 copies/mL for SARS-CoV-2 Alpha and Omicron variants, influenza A, influenza B and RSV, respectively. Analytical specificity was 100%, while CV% was less than 5. The new assay correctly identified 100%, 95.1%, 97.5% and 94.8% of positive specimens for SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B and RSV, respectively.

As a result, reliable quantitative standards were obtained for influenza A, influenza B and RSV by the dPCR method using pooled patient samples. LoD and reproducibility studies of a commercial qRT-PCR assay were successfully carried out with these standards. The validation analysis of the new multiplex qRT-PCR assay has shown that the test is suitable for use in the diagnostic setting. False negatives may occur in some samples with low levels of target virus.

Keywords: Validation, multiplex qRT-PCR, dPCR, Influenza, RSV, SARS-CoV-2

Page Number: 97

Advisor: Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Solunum yolu enfeksiyonlarının doğru, hızlı ve maliyet etkin tanısı ve zamanında sonuç alınması kritik öneme sahiptir. Sonbahar ve kış aylarında viral solunum yolu enfeksiyonlarının yaygın olduğu dönemlerde, genellikle birden fazla virüs aynı anda dolaşmakta olup etken klinik olarak ayırt edilememektedir. Solunum sinsityal virüsü (RSV) salgınları sıklıkla influenza ile eş zamanlı olarak meydana gelmekte olup, önemli bir mortalite ve morbidite sebebi olarak önem kazanmaktadır. SARS-CoV-2'nin başlıca solunum yolu virüsleri arasına eklenmesiyle birlikte, influenza, RSV ve SARS-CoV-2'nin ayrımı; hasta tedavisi, yönetim stratejileri, aşılama programları ve temaslılar için izolasyon prosedürlerine dair bilinçli kararlar almak için önemli hale gelmiştir.

Klinik bulgularla patojenlerin ayırt edilmesi mümkün olmadığından, kesin tanı için mikrobiyolojik testler gereklidir. Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı sendromik paneller, solunum yolu virüslerinin tanısında yaygın bir yöntemdir. Ancak çok sayıda virüs için kullanılan panellerin maliyeti, bu panellerin kullanımında önemli bir sınırlamadır. Klinik olarak daha ciddi sonuçlara yol açan ve hızlı tanı ile tedavi düzenlemesinin yapılabildiği üç ana virüs (SARS-CoV-2, RSV ve influenza virüsü) üzerine odaklanmak daha maliyet etkin bir yaklaşımdır. Belirtilen virüsler için örnek negatif çıkarsa, ikinci aşamada diğer patojenler için multipleks testler kullanılabilir.

Yeni bir test veya test sistemi, rutin tanı laboratuvarında kullanılmadan önce validasyon veya verifikasyon çalışmalarından geçmelidir. Bu değerlendirmenin gereklilikleri çeşitli rehberlerde belirtilmiştir. Validasyon çalışmalarında kantitatif standart materyaller gereklidir. Bu tür materyaller ticari olarak satın alınabilir ya da nükleik asit testlerinde plazmid olarak üretilebilir. Plazmid materyaller, tam mikroorganizma yapısını yansıtmadığı, virüslar açısından düşünüldüğünde, gerçek bir viriyon olmadığı için elde edilen validasyon sonuçları, gerçek hasta örneklerine ait sonuçlardan uzaktır. Sentetik nükleik asitler yerine gerçek virüsü içeren örneklerin kullanılması, değerlendirilen tanı yönteminin ekstraksiyon, revers transkripsiyon ve amplifikasyon dahil tüm basamaklarının, gerçek hayattakine uygun şekilde değerlendirilmesini sağlar. Rutin tanıda kalitatif olarak çalışılan viral etkenler için

(solunum yolu virusları gibi) kantitatif standartlar ticari olarak kısıtlıdır. Nükleik asit kantitasyonu için farklı yöntemler bulunmakla birlikte en güncel ve güvenilir metod, dijital PCR (dPCR) yöntemidir. Bu çalışmada, influenza A virüs, influenza B virüs ve RSV RNA pozitif olduğu bilinen hasta numuneleri ile havuzlanarak hazırlanmış materyalde dPCR yöntemi kullanılarak kantitatif standartların elde edilmesi ve dPCR ile kantite edilen materyaller kullanılarak ticari bir real time qRT-PCR tanı testinin (Diagnovital Influenza A/B SARS Cov-2 RSV Multipleks Real-Time PCR Kit, A1-LifeSciences, Turkey) validasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda H0 hipotezimiz "Diagnovital® multipleks qRT-PCR testinin RSV, Influenza A/B ve SARS-CoV-2'yi eş zamanlı ve doğru bir şekilde tespit etme kapasitesi yoktur", H1 hipotezimiz ise "Diagnovital® multipleks qRT-PCR testi, RSV, Influenza A/B ve SARS-CoV-2'yi eş zamanlı ve doğru bir şekilde tespit edebilir" şeklindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Moleküler Tanı

Moleküler tanı testleri, duyarlılık, hız ve doğruluk açısından virolojide viral izleme ve tespiti iyileştiren tanı araçlarıdır. Daha yavaş ve daha az duyarlı olabilen geleneksel kültür yöntemleri, hasta örneklerinden viral nükleik asitlerin doğrudan tanımlanmasını sağlayan polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ve gerçek zamanlı PCR gibi tekniklerle değiştirilebilir. Niesters, gerçek zamanlı moleküler testlerin bir dizi viral enfeksiyonun hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağladığını ve doktorlar tarafından gerçek zamanlı viral yük izlemesini sağladığını vurgular; bunların her ikisi de epidemiyolojik izleme ve hasta bakımı için kritik öneme sahiptir (1). Acil tedavi gerektiren enfeksiyonların teşhisinde yüksek özgüllükleri ve duyarlılıkları nedeniyle, moleküler teknikler klinik karar almada çok önemlidir (2).

Klinik viroloji, viral patojenlerin hızlı, hassas ve özgül tespitini sağlayan moleküler tanı yöntemlerinin benimsenmesiyle önemli ölçüde ilerlemiştir. Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) gibi varyasyonları, özellikle HIV, HBV ve HCV gibi patojenlerin viral yüklerinin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, belirli DNA veya RNA dizilerini çoğaltarak, düşük viral yüklerin doğrudan klinik örneklerden tespit edilmesini oldukça etkili hale getirir (2).

Multipleks PCR, tek bir testte birden fazla patojenin eşzamanlı olarak tespit edilmesine olanak tanır ve bu da birden fazla virüsün bulunabileceği solunum yolu enfeksiyonlarının teşhisinde çok değerlidir (3). Ters Transkripsiyon PCR (RT-PCR), SARS-CoV-2 gibi RNA virüsleri için de kritik öneme sahiptir, çünkü bu yöntem viral RNA'yı tamamlayıcı DNA'ya dönüştürür ve ardından çoğaltıp tespit eder (4).

Daha kapsamlı bir viral analiz için Yeni Nesil Dizileme (*NGS*) teknolojisi, yüksek verimli genomik dizileme sağlayarak tanısal virolojide çığır açmıştır. NGS, büyük miktarda genetik materyali analiz ederek bilinen ve bilinmeyen (yeni keşfedilecek) virüsleri tanımlar, bu da salgın yönetimi ve viral evrim çalışmaları için kritik bilgiler sağlar (5).

Başka bir moleküler yöntem olan Nükleik Asit Dizi Bazlı Amplifikasyon (NASBA), RNA virüslerini çoğaltmak için özellikle uygundur ve çeşitli klinik ve çevresel örneklere uygulanabilir. Ek olarak, Döngüye Dayalı İzotermal Amplifikasyon (LAMP), izotermal koşullarda DNA'yı çoğaltarak PCR'a hızlı bir alternatif sunar ve bu da düşük kaynaklı ortamlar için ekipman gereksinimlerini basitleştirir (6).

Son olarak, dijital PCR, yüksek hassasiyet ve referans standartlarına ihtiyaç duymadan mutlak kantifikasyon sağlar; bu da onu kesin viral yük izlemesi için tercih edilen bir seçenek haline getirir. Dijital PCR, daha yüksek hassasiyet, doğruluk ve inhibitörlere karşı dayanıklılığı nedeniyle kantitatif PCR'ye (qPCR) kıyasla giderek daha fazla kullanılmaktadır ve özellikle virüs miktarının belirlenmesi, mutasyon tespiti ve çevresel DNA ve RNA örneklerinin analizi gibi alanlarda fayda sağlamaktadır. Ancak, sağladığı daha doğru veriye rağmen, yüksek maliyet ve daha düşük işleme kapasitesi, özellikle pandemi gibi yüksek talep gerektiren durumlarda yaygın kullanımını kısıtlamaktadır (7).

Virolojide kullanılan tanı yöntemleri temel olarak amplifiye edilmemiş nükleik asit probları ve amplifiye edilmiş nükleik asit tekniklerini içerir:

1. Amplifiye Edilmemiş Nükleik Asit Probları: Bu yöntemde DNA veya RNA segmentleri, hedef mikroorganizmanın nükleik asit dizileri ile eşleşerek bağlanır. Hibridizasyon çeşitli biçimlerde uygulanabilir, ancak genellikle düşük analitik hassasiyet nedeniyle, yüksek mikroorganizma yoğunluğu gerektiren durumlarda kullanılır.

2. Amplifiye Edilmiş Nükleik Asit Teknikleri: Bu gruptaki teknikler hedef, sinyal veya prob amplifikasyonuna dayanır.

- Sinyal Amplifikasyonu: Dallanmış DNA (bDNA) testleri ve hibrid yakalama testleri gibi yöntemler sinyalin doğruluğunu artırır. Bu yöntemler genellikle HCV, HBV ve HIV gibi virüslerin tespiti için kullanılır (8).

- Hedef Amplifikasyonu: PCR, gerçek zamanlı PCR, RT-PCR, Nested PCR, Multipleks PCR ve NASBA gibi yöntemler hedef nükleik asit dizisinin milyonlarca kopyasını üreterek hassas bir tanı sağlar.

- Prob Amplifikasyonu: Ligaz zincir reaksiyonu (LCR) ve döngü prob teknolojisi (CPT) gibi yöntemlerle yalnızca prob içindeki diziler çoğaltılır. HPV, HSV ve HIV gibi virüslerin tespiti için kullanılır (9).

3. İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri: *LAMP* (döngü aracılı izotermal amplifikasyon) ve helikaz bağımlı amplifikasyon (HDA) gibi teknikler, termal döngüleme ihtiyacı olmadan hız ve basitlik sunar. Bu yöntemler özellikle saha çalışmaları ve hızlı tanı amaçları için uygundur.

4. Mikroarray Teknolojisi: Çok sayıda virüsün aynı anda tespiti için kullanılan bu yöntem, genellikle HIV ve solunum yolu virüslerinin hızlı tanısında etkilidir.

5. Çoklu Mikroküre Tabanlı Dizi Teknolojisi: Luminex gibi sistemler, hassasiyet ve özgüllük açısından avantajlar sunarak HIV, HCV ve HSV gibi virüslerin hızlı tespiti ve miktar tayini için kullanılmaktadır (10).

2.2.Dijital PCR

Dijital PCR (dPCR), hedef nükleik asitin mutlak miktarının belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Özellikle genetik mutasyonların yüksek duyarlılıkla tespit edilmesinde kullanılan hassas bir ölçüm aracı olarak ortaya çıkmıştır (11). dPCR, hem klinik uygulamalarda hem de temel araştırmalarda, özellikle farklı kanser türlerinde tümör belirteçlerinin ve bulaşıcı hastalıklarla ilgili patojen mutasyonlarının tespitinde önemli bir değere sahiptir (12). Günümüzde standart nükleik asit tanı yöntemi haline gelmiş olan kantitatif PCR (qPCR) sistemlerinin aksine, kantitasyon yaparken standartlara ve kalibrasyona ihtiyaç duymaması, bu sayede laboratuvarlar arası yüksek düzeyde tekrarlanabilir kantitatif ölçüm imkânı sunması, moleküler tanı ve tedavide önemli bir araç haline gelmesini sağlamıştır. dPCR, geleneksel PCR tekniklerini tamamlayan, onkoloji ve invazif olmayan doğum öncesi testler gibi çeşitli alanlarda yüksek hassasiyet ve önemli uygulamalar sunan üçüncü nesil bir teknolojidir (13). Ancak dPCR'nin klinik laboratuvarlarda doğru şekilde uygulanması için eğitim ve önlemlere dikkat edilmesi gereklidir.

Dijital PCR (dPCR) cihazları, çipler (14), yağ içinde su emülsiyonları veya damlacıklar yoluyla (15) bölümlendirme yapar. Bu partisyonlar, qPCR' da total hacim içinde gerçekleştirilen polimeraz zincir tepkimesinden farklı olarak, bir reaksiyonu binlerce küçük hacme bölerek her bölümde ayrı bir polimeraz zincir tepkimesinin gerçekleşmesini sağlar. Böylece pozitif reaksiyon veren bölümlerdeki ışımalar toplanarak, Poisson dağılımı esası ile değerlendirilir ve kantite bir sonuç elde edilir (16).

Çip bazlı yöntemlerde, reaksiyonlar, gerçek zamanlı veya uç nokta analizine olanak tanıyan küçük hacimli, katı bölümlerde gerçekleştirilir. Bu bölümlere "partisyon (bölme)" denir. Mevcut çip platformlarındaki partisyon sayıları genellikle, damlacık esaslı cihazların sunduğundan daha azdır. Sonuç olarak çiplerin dinamik aralığı, tipik olarak damlacıklı cihazlara göre daha dardır. Bu nedenle, istenen hassasiyetin elde edilmesi için bir başlangıç dPCR titrasyon deneyi veya qPCR analizi ile edilen yaklaşık kopya sayısına ilişkin bilgi önceden gerekli olabilir (17).

Emülsiyon (veya damlacık) dPCR (ddPCR), yağ içinde su emülsiyon damlacıklarından oluşan bölmelerde meydana gelir. Emülsiyon esaslı cihazlar, damlacıklar halinde bölmeler oluşturulması için ekstra bir cihaza ihtiyaç duyar ve çoğu çip bazlı cihaza göre daha fazla bölme oluşturulabilir. Partisyon sayısı dijital PCR'da önemlidir. Giriş nükleik asit konsantrasyonu düşük olduğunda genellikle bir sorun görülmese de, yüksek konsantrasyona sahip numunelerde, numunede bulunan DNA veya cDNA'nın yeterli sayıda partisyona dağılımı önemlidir. Yüksek konsantrasyonlu nükleik asitlerde partisyon başına fazla sayıda nükleik asit düşmekte, bu da cihazın kantitasyon üst sınırını aştığı için sonuç alınamamaktadır. Emülsiyon dPCR ise geniş bir aralıkta numune konsantrasyonunun analizine olanak tanır (18). Ancak damlacık sistemlerinin ıslak laboratuvar işlemleri kademeli ve daha zahmetlidir.

2.3.Dijital PCR'ın Uygulama Alanları

dPCR'ın kullanım alanları giderek çeşitlenmekte, DNA, RNA, epigenetik çalışmaları kapsamaktadır. Yöntemin popüler kullanımı, nadir genetik varyantların (örneğin, tek nükleotid varyantları) tespiti ve miktarının belirlenmesidir (19). Bu tür nadir dizilerin tespiti, ctDNA'daki ("*circulating tumor DNA"*) mutasyonları, invazif olmayan doğum öncesi testlerdeki fetal genetik varyantları, potansiyel organ/doku

reddinin öngörülebilmesi için donör organdaki polimorfizmleri, nadir bakteriyel genotipleri (20) ve viral ilaç dirençlerini (21) saptayabilir.

Optimal şartlarda tasarlanmış ve yürütülmüş dPCR deneyleri, qPCR deneylerinden daha kesin sonuçlar sağlayabilir (22). Bu tür hassas ölçümlere, cDNA konsantrasyonları ölçülürken veya genetik kopya sayısı varyasyonları tahmin edilirken sıklıkla ihtiyaç duyulur (23). qPCR genelde en iyi ihtimalle ve ideal koşullar altında 1,25 ila 1,5 kat farkları ölçebilir (24). qPCR ile karşılaştırıldığında dPCR, <1,2'lik daha küçük farkları saptayabilmektedir (22).

Duyarlılık açısından dPCR, qPCR'den daha üstün bir yöntemdir (25). Her bir reaksiyon hücresini, pozitif (reaktif) veya negatif (non-reaktif) olarak saydığı için kopya sayısı belirlemede kullanımı daha kolaydır. dPCR, tekrarlanabilirliği yüksek bir tekniktir, bu sayede aynı hedef, farklı laboratuvarlarda ve farklı dPCR testleri ile ölçüldüğünde benzer sonuçlar alınır (26). Bu özellik, hem plazmid gibi pürifiye nükleik asit saptanırken hem de ekstraksiyon gibi preanalitik adımların dahil edildiği biyolojik numuneler ile çalışılırken saptanmıştır. Bu yönü ile, dPCR, referans materyallerin kantite edilmesinde, klinik tanı ve gıda analizlerinde moleküler testlerin desteklenmesinde popüler bir yöntem haline gelmiştir (27).

dPCR optimal şartlarda çalışmış olsa bile, yöntemin performansı, reaksiyona eklenen hedef şablonun (“template”) miktarına bağlıdır. dPCR' den işleminden önceki adımlar sırasında ortaya çıkan hatalar (ekstraksiyon, şablon modifikasyonu veya ters transkripsiyon gibi) sonuçları etkileyecektir. Bununla birlikte, eğer preanalitik hata büyükse, doğruluk (ölçülen büyüklük değeri ile gerçek nicelik değer arasındaki uyumun hem kesinlik hem de bias açısından yakınlığı) tehlikeye girecek ve sonuçlar yanlış olacaktır. Bu durum, ekstrakte edilen nükleik asitlerin hem miktarını hem de kalitesini bozacağı için dPCR sonucunu da etkiler (28).

dPCR' de çeşitli kontrol reaksiyonları gereklidir. Primerler ve problar dahil olmak üzere reaksiyon karışımını içeren ancak hedef nükleik asiti içermeyen negatif kontroller, numuneler arasındaki çapraz kontaminasyonları ve amplifiye ürün kaynaklı kontaminasyonu saptayabilmeyi sağlar. İncelenen örneklerdeki DNA konsantrasyonları yüksekse, çapraz kontaminasyonu izlemek için negatif kontrol

sayısı arttırılabilir. dPCR deneylerinde kullanılan bir diğer negatif kontrol, hedef gen bölgesinden farklı DNA/RNA içeren örneklerdir. Bu kontroller kontaminasyonun yanı sıra dPCR'ın özgüllüğünü de değerlendirebilir. Özellikle vahşi tip sekans içeren numunelerdeki nadir genetik varyantları ölçerken bu tip negatif kontrolleri kullanmak önem taşır. Ayrıca, gerçek numuneleri ölçerken ekstrakt kalitesi floresans yoğunluğunu etkileyebilir ve bu da tepe çözünürlüğünde değişikliklere yol açabilir. Negatif kontroller kadar, gerçek numuneleri karmaşıklık, bütünlük, saflık ve konsantrasyon açısından ideal şekilde yansıtan pozitif kontrollerin kullanılması da önemlidir. dPCR, inhibisyondan nadiren etkilense de inhibisyon açısından izlem yapılmalıdır (29). Internal (iç) kontroller sayesinde negatif sonuçlar doğrulanmalıdır. Bu durum özellikle klinik tanı amacı ile dPCR kullanıldığında önem taşır. İç ve dış kontroller kalite güvencesi sağlar ve preanalitik adımları değerlendirirken faydalıdır.

Dijital PCR'ın (dPCR) klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında çeşitli uygulamaları vardır. Hedef nükleik asitlerin yüksek hassasiyet, kesinlik ve çözünürlükle mutlak miktarının belirlenmesi için kullanılabilir (30). dPCR, kültürü zor mikroorganizmaların tespiti ve tanımlanması için de uygulanmaktadır (31). dPCR, amplifikasyon inhibitörlerinden ve amplifikasyon verimliliğini azaltan faktörlerden daha az etkilendiği için viral kantitasyon amacı ile kullanılabilir (32). Genel olarak dPCR, klinik mikrobiyolojide duyarlılığı, özgüllüğü, doğruluğu ve tanı süresini iyileştirme potansiyeline sahip bir teknik olarak öne çıkmaktadır.

2.3.1. Dijital PCR Sonuçlarının Analizi

dPCR sonuçlarının Poisson dağılımını takip edebilmesi için bir takım koşulların karşılanması gerekir (33): 1) Pozitif ve negatif partisyonlar arasındaki ayrımın net olması (yağmur fenomeni istenmez); 2) Her bir partisyona eşit hacimde örnek dağılması; 3) Hedef moleküllerin partisyonlar arasında rastgele dağılmış olması.

Tipik bir dPCR analizinde şu adımlar bulunur: 1) Partisyonların pozitif veya negatif olarak sınıflandırılması; 2) Poisson istatistiklerine dayalı olarak negatif (veya pozitif) partisyonların oranını kullanarak λ'nın belirlenmesi; 3) Tekrarlanan reaksiyonların işlenmesi; 4) Normalizasyon ve/veya yeniden ölçeklendirme.

İdeal dPCR dağılım grafiği, pozitif ve negatif partisyonlar arasında net bir farka sahiptir. Ancak 'yağmur' olarak tanımlanan orta derecede floresanslı bölümler sıklıkla gözlemlenir. Yağmur fenomeni, genellikle template erişilebilirliği, optimal olmayan bağlanma sıcaklığı, PCR inhibitörleri ve test ile hedef diziler arasındaki uyumsuzluklar sonucu gözlenir (34). Problarla yapılan çalışmalar, *annealing* süresinin uzatılmasının, döngü sayısının arttırılmasının ve optimum bağlanma sıcaklığı kullanımının yağmur fenomenini etkili bir şekilde azaltabileceğini ve pozitif fraksiyona atanan bölmelerin doğruluğunu artırabileceğini göstermektedir (35). Bu "yağmurlu" bölümler gerçek hedef dizileri içerebilir; bunları dışlamak, özellikle PCR inhibisyonu veya yüksek dizi varyasyonu olan durumlarda negatif bir yanlılığa yol açabilir.

dPCR'nin Poisson dağılımına uyması için iki varsayım bulunur: a) Tüm partisyonların eşit hacimde olması ve b) Hedef moleküllerin partisyonlar arasında rastgele dağılmış olması (36). Teorikte, her pozitif partisyon eşit nükleik asit içerir kabulüyle yaklaşılır. Pozitif partisyonların içine dağılan hedef moleküllerin sayısı bir, iki veya daha fazla olabilir, belirli bir pozitif partisyonun kaç tane molekül içerebileceğini önceden ayarlamak imkansızdır. Buna karşılık, negatif bir partisyondaki moleküllerin sayısı bilinmektedir. Tüm partisyonlar eşit hacimdeyse, partisyon başına hedef moleküllerin ortalama miktarı (λ), negatif partisyonların oranı ve Poisson dağılımı (λ = **-ln (w/n)**) kullanılarak bir partisyonun negatif olma olasılığından hesaplanabilir. Bu konsantrasyon, negatif bölümlerin sayısından (w) ve reaksiyondaki toplam partisyon sayısından (n) türetilir. Dijital PCR verilerinin yayınlanması sırasında belirtilecek minimum veriler içerisinde λ (partisyon başına ortalama kopya sayısı) önemli bir veri olarak Kabul edilir. λ hesaplandıktan sonra, verilmesi elzem olan bir diğer veri de "göreceli belirsizlik ("*relative uncertainty" (Urel)*)" değeridir. Göreceli belirsizlik, aşağıdaki formüllerle elde edilir:

Pozitif partisyonların oranı $p = \frac{k}{n}$; p (pozitif partisyon sayısı), n (geçerli toplam partisyon sayısı)

(p)'nin standart sapması $s = \sqrt{\frac{px(1-p)}{n}}$

p'nin %95 üst güven limiti (p_u)= $p + (1.96\ x\ s)$

$\lambda = -\ln\left(\frac{w}{n}\right)$; w (negatif partisyon sayısı (1)

λ'nin %95 üst güven limiti (λ_u)= $-\ln(1-pu)$

Göreceli belirsizlik (U_{rel}) (CI %95)= $\frac{\lambda u-\lambda}{\lambda}$ (37) (2)

Bu çalışmada kullanılan çip bazlı dijital PCR sisteminde toplam 26 bin kuyucuk (partisyon) yer almaktadır. 40 µl toplam örnek hacmi ile çalışılmaktadır. Bu durumda her bir partisyona düşen hacim 0,0015 µl olmaktadır. Doğal olarak her çalışmada tüm partisyonlar bu hacimle eşit miktarda dolmamaktadır, fakat hesaplamaların yapılabilmesi için bu varsayımın yapılması gerekmektedir. Ayrıca her bir çalışmada, 26 bin partisyonun hepsi dolmamaktadır. Geçerli partisyon sayıları 25450-25490 arasında değişiklik göstermektedir. Bu sebeple, hesaplamalarda bu verilerin mutlaka elde edilmiş ve kaydedilmiş olması gerekmektedir. Bir örnek verecek olursak, kullanılan dPCR sisteminde, toplam hacimde 1 adet pozitif partisyon, 25467 adet negatif partisyon olsun. Yani geçerli partisyon toplamda 25468 adettir. Partisyon başına düşen minimum kopya sayısı (λ=-ln(w/n))= 0,000039 olarak ölçülmektedir. Bu aslında toplam 25468 geçerli kuyucuğun her birinde 0,000039 adet kopya olduğu varsaymaktadır. Bu sayı toplam partisyon ile çarpılırsa = 0,000039*26000= 1 olarak bulunur. Böylece toplamda 1 kopya, bu hesaplama ile elde edilmiş olur. Poisson dağılımına göre cihaz, bu şekilde hesaplama yapmaktadır.

Bir dPCR testinin dinamik aralığı, analiz edilen partisyon sayısı ile sınırlıdır, bu sebeple testin kesinliği her iki uçta da bozulur. Bunun aksine, qPCR kesinliği yalnızca düşük kopya sayılarında bozulur. dPCR, partisyon başına yaklaşık 1,59 moleküllük optimal konsantrasyonda en hassastır (24). Sonuç olarak, en hassas ölçümler için konsantrasyonun önceden belirlenmesi gerekir. Bu özellikle belli bir partisyon sayısına sahip olan çip bazlı sistemlerde daha fazla önem taşır.

Uluslararası sertifikalı referans materyalleri oluşturmak için birincil referans yöntem olarak dPCR'ın kullanılması önerilmektedir (21,38,39). Metrolojik gruplar,

dPCR'nin uygulamaya girmesinden bu yana, yöntemi bu amaçla kullanmaktadır. Hem bulaşıcı ajanlar hem de moleküler onkoloji analizlerinde, kopya sayısı belirlemek için dPCR'ye dayalı sertifikalı referans materyaller mevcuttur. Kantitatif referans materyal eldesindeki en büyük sorun, uzun süreli saklama ve transport aşamalarında viral yük kaybının olabilmesidir (40). Bu durum, moleküler mikrobiyolojik kantitatif standart materyaller için en büyük zorluktur. Dünya Sağlık Örgütü standartlarının belirlenmiş üreticisi *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC)' dir. Birçok virus için standart kantitatif 11aterial üreten bu kurum, bazı viruslar için yalnızca kalitatif paneller sunmaktadır. Bu da, özellikle testlerin validasyon basamaklarının kurallara uygun olarak gerçekleştirilmesinde sıkıntılar yaratmaktadır.

2.4.Multipleks Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

Multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun ortaya çıkışı, tek bir analizde birden fazla viral patojenin eş zamanlı olarak tespit edilmesine olanak sağlayarak tanıda devrim yaratmıştır. Bu yaklaşım tanı verimliliğini arttırarak, analiz için gereken süreyi azaltır ve genel laboratuvar iş akışını iyileştirir. Multipleks gerçek zamanlı PCR teknolojisi çeşitli DNA veya RNA hedeflerine özgü florofor etiketli problar aracılığıyla birden fazla hedefin eş zamanlı olarak çoğaltılmasını mümkün kılar. Bu yetenek, özellikle aynı anda birden fazla enfeksiyon (ko-enfeksiyon) varlığını tanımlamak ve viral suşlar arasında ayrım yapmak için virolojide çok değerlidir. Multiplekslemenin konsolide analizler yoluyla maliyetleri ve iş gücünü azaltarak rutin tanı hizmetlerini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (41).

Gerçek zamanlı PCR, duyarlılığı, hızı ve tekrarlanabilirliği nedeniyle yaygın olarak benimsenmiştir. Ancak multipleksleme, her hedefin birbiriyle etkileşime girmeyen belirli primer ve prob kombinasyonları gerektirmesi nedeniyle, test tasarımında karmaşıklıklar ortaya çıkarır. TaqMan probları ve moleküler işaretleyiciler gibi çeşitli kimyasallar, tek bir reaksiyon içinde birden fazla viral hedefi tespit etmede özgüllük için kullanılır (42). Ayrıca, Roche'un LightCycler 480 gibi platformları, yüksek verimli tanılama sağlayarak multipleksleme sürecini kolaylaştırmıştır (43).

Virolojide, multipleks PCR, solunum virüsleri, herpes virüsleri ve gastroenterik virüsler dahil olmak üzere çeşitli patojenleri teşhis etmek için kullanılır

(44). Multipleks testler klinik ortamlarda çok önemlidir, çünkü eş zamanlı tespit tanısal geri dönüş süresini azaltır ve hasta sonuçlarını iyileştirir (45).

Multiple gerçek zamanlı PCR'yi optimize etmek, primer konsantrasyonlarını ayarlamayı, uygun floroforları seçmeyi ve tüm test bileşenleri arasında uyumluluğu sağlamayı içerir. Çok Renkli Kombinasyonel Prob Kodlaması (MCPC) gibi yenilikler, kombinasyonel etiketleme tekniklerini kullanarak tespit edilebilir hedeflerin potansiyel sayısını artırır (46).

2.4.1. Solunum Yolu Patojenleri Tanısında Multipleks PCR

Akut solunum yolu hastalığı (*ARD*), dünya çapında tüm akut morbiditelerin ve mortalitelerin büyük bir kısmını oluşturur ve bunlar arasında akut viral solunum yolu enfeksiyonu önde gelen nedendir (%80) (47).Başlıca viral patojenler arasında influenza virüsü, solunum sinsityal virüsü (RSV), koronavirüs, adenovirüs ve rinovirüs bulunur. Beş yaşın altındaki çocuklarda, yalnızca influenza ve RSV'nin birleşik küresel mortalitesi her yıl 300.000 ölüme ulaşmaktadır (48). Adenovirüs ve rinovirüs gibi diğer solunum yolu virüsleri daha düşük mortalite ile ilişkilidir, ancak önemli bir morbiditeye neden olur ve büyük bir ekonomik yüke neden olur (49). Şiddetli akut solunumyolu sendrom koronavirüsü (SARS-CoV) ve Ortadoğu solunum yolu sendrom koronavirüsü (MERS-CoV) gibi salgınlara veya pandemilere neden olabilen oldukça patojenik yeni ortaya çıkan ve yeniden ortaya çıkan koronavirüsler, küresel halk sağlığı için büyük tehdit oluşturmuştur. Bu koronavirüsün tam genom dizisi Ocak 2020'de yayınlanmış, virusun SARS-CoV ve yarasa SARS benzeri koronavirüsün (SL-CoV) dizileriyle %82'den fazla aynı olduğu görülmüştür (50).

İnfluenza virüsleri, Orthomyxoviridae ailesine aittir. Bu aile, iç nükleoprotein (NP) ve matris (M) proteinlerine göre sınıflandırılan beş cinsten (influenza A/B/C virüsü, Thogotovirüs ve Isavirüs) oluşur. Bu cinsler arasında yalnızca influenza A ve influenza B virusları klinik tablolara neden olur. İnfluenza B viral enfeksiyonları genellikle lokalize salgınlara neden olurken, influenza A virüsü insan enfeksiyonlarının birincil patojenidir ve dolayısıyla büyük influenza salgınlarının ve pandemilerinin başlıca nedenidir. Viral yüzeyde bulunan glikoproteinler hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) temelinde influenza A virüsleri çeşitli alt tiplere ayrılır. Şimdiye kadar 18 hemaglütinin (H1-H18) ve 11 nöraminidaz (N1-N11) alt tipi

tanımlanmıştır. Klinik laboratuvarlarda influenza virüslerini tespit etmek için virüs izolasyonu ve bazı yeni moleküler tabanlı yaklaşımlar da dahil olmak üzere bir dizi tanı yaklaşımı kullanılmıştır (51).

İnsan RSV, Paramyxoviridae ailesine ait, segmentsiz, negatif polariteli, tek zincirli (-ssRNA) bir RNA virüsüdür. RSV'nin genomu, on bir proteini kodlayan on gen içerir. RSV, genom dizisine ve yüzey glikoproteinine (G) ve füzyon proteinine (F) karşı monoklonal antikorların (mAbs) reaktivitesine göre A ve B alt gruplarına sınıflandırılabilir. RSV, bebekler ve yaşlı popülasyonlar gibi bağışıklık sistemi baskılanmış popülasyonlarda ciddi solunum yolu hastalıklarının önde gelen nedenidir ve dünya çapında önemli morbidite ve mortaliteye sahiptir. Uygun tedavi için erken ve doğru RSV tanısı son derece önemlidir (52,53).

Koronavirüsler Coronaviridae familyasına aittir. Yarasa, çeşitli koronavirüslerin doğal rezervuarı ve vektörleri olarak tanınmıştır ve virüsler tür bariyerlerini aşarak insanları ve kuşlar, kemirgenler ve uçan böcekler de dahil olmak üzere birçok farklı hayvan türünü enfekte etmiştir (54,55). Koronavirüs solunum ve nörolojik hastalıklara neden olabilir (56). Şimdiye kadar; HKU1, 229E, NL63, OC43, SARS-CoV ve MERS-CoV olmak üzere altı insan koronavirüsü tanımlanmıştır (57). MERS-CoV, ilk olarak Haziran 2012'de bildirilen ve insanlarda solunum yolu hastalıklarına neden olabilen bir insan koronavirüsüdür (56). Koronavirusların genomu diğer tüm RNA virüslerinden daha büyüktür, tek sarmallı pozitif polariteli bir RNA'dan oluşur ((27-32 kb), +ssRNA). Nükleokapsid proteini (N), genomun dışını oluşturur ve genom üç yapısal protein ile ilişkili olan bir zarfla çevrilidir: membran protein (M), spike protein (S) ve zarf protein (E) (58). Koronavirüs ailesine pandemi ile eklenen SARS-CoV-2' nin genomu yaklaşık olarak 29,9 kb'dir (59). SARS-CoV-2, 4 yapısal protein (S, E, M ve N) ve onaltı yapısal olmayan protein (nsp 1−16) içerir.

Solunum yolu enfeksiyonlarının doğru, hızlı ve uygun maliyetli tanısı ve zamanında sonuçlar kritik öneme sahiptir. Viral solunum yolu enfeksiyonlarının yaygın olduğu sonbahar ve kış aylarında, birden fazla virüs genellikle aynı anda dolaşır ve etken madde klinik olarak ayırt edilemez (60,61). SARS-CoV-2'nin başlıca solunum yolu virüslerine eklenmesinin ardından (62), Influenza, RSV ve SARS-CoV-2'nin farklılaştırılması, hasta tedavisi, yönetim stratejileri, aşılama programları ve temaslıların izolasyon prosedürleri ile ilgili bilinçli kararlar için çok önemlidir (63).

Kesin tanı mikrobiyolojik test gerektirir çünkü klinik bulgular patojenler arasında ayrım yapamaz. Multipleks polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı sendromik paneller solunum yolu virüslerini teşhis etmek için yaygın bir yöntemdir. Ancak çok sayıda virüs için panellerin maliyeti, kullanımlarında önemli bir sınırlamayı temsil eder. Daha ciddi klinik sonuçları olan ve tedavinin hızlı tanı ile değiştirilebildiği üç ana virüse (SARS-CoV-2, RSV ve influenza virüsü) odaklanmak daha uygun maliyetlidir (64). Numunenin yukarıda belirtilen virüsler için negatif olması durumunda, ikinci adım olarak diğer patojenler için multipleks testler kullanılabilir (65).

Semptomları olan hastalarda tek solunum yolu virüsleri tespit edilebilse de, aynı anda başka solunum yolu virüsleri de bulunabilir. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda daha sık eş enfeksiyon görülür (66). Tek bir tüpte birden fazla viral gen hedefi içeren multipleks analizler, aynı anda birkaç potansiyel viral patojenin hızlı bir şekilde tespit edilmesi avantajına sahiptir. Multipleks gerçek zamanlı PCR, kısa sürede birden fazla solunum yolu virüsünün eş zamanlı olarak tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Singlepleks yaklaşımıyla karşılaştırıldığında, multipleks tanı yaklaşımı daha yüksek örnek verimine (çalışma başına 96 örnek), daha kısa geri dönüş süresine (ortalama 3 saat) ve daha az örnek gereksinimine sahiptir (67).

Tüm dünyada kullanılan birçok multipleks solunum yolu etken nükleik asit testi vardır (67–72). Bu testler tablo 1'de verilmiştir (73).

Tablo 1. Rutinde kullanılan bazı multipleks solunum yolu patojen nükleik asit tanı testleri

Test	Patojen Hedefi	Duyarlılık/Analitik Duyarlılık	Özgüllük	Zaman verimliliği	Benzersiz güçler
mOTNRT-PCR	RSV, hRV, hMPV	5 kopya/mL	%100	2,7 saat	Yüksek duyarlılık ve maliyet etkin
Panther Fusion	inf A/B, RSV, adenovirüs, hRV, PIV, hMPV	%100 PPA (NP)	%98.4-%100 (NP)	Ortalama	Daha yüksek patojen kapsamı
FTD21 Kit	Adenovirus, RSVA/B, koronaviruslar (NL63, 229E, OC43 ve HKU1),	%97.3	%100	Standart	Yüksek hassasiyet, geniş patojen spektrumu

	inf A (H1, H1-2009), inf B, hRV, hMPV A/B hPIV 1/2/3/4				
GeXP	inf A (H1), inf B, hPIV 1/2/3, hRV, adenovirus, RSVA/B, hMPV, koronaviruslar (OC43, NL63, 229E, HKU1), hBoV	20-200 kopya/mL	Yüksek	Ortalama	Multipleks kapasitesi yüksek
Qiagen ResPlex II V2.0	Inf A/B, RSV, hPIV 1/2/3/4, hMPV, RV, enterovirus, hBoV, adenovirus, koronaviruslar (OC43, NL63, 229E, HKU1) ve infA pdm09	%55.6-%73.1 (PIV)	%92.9-%100	Ortalama	Daha yüksek patojen kapsamı
FilmArray	Adenovirus, RSV A/B, koronaviruslar (OC43, NL63, 229E, HKU1), hMPV, hRV/hEV, inf A (H1, H1-2009, H3), inf B, PIV 1/2/3/4	%86.4-%100	%100	1 saat	Hızlı, tam otomatize sistem
Luminex NxTAG-RPP	Adenovirus, hRV, influenza virüs	%98.9	%99.0	Yüksek işlem kapasitesi	Büyük ölçekli tanı işlemleri için ideal

Tüm testlerin kendi içinde diğerlerine göre avantajları/üstünlükleri vardır. Her multipleks PCR testi, belirli ihtiyaçlara göre uyarlanmış benzersiz güçlü taraflara sahiptir. mOTNRT-PCR sınırlı sayıda patojen için yüksek duyarlılık sunarken, Luminex NxTAG ve FilmArray sistemleri gibi daha geniş kapsamlı testler yüksek verimlilikle kapsamlı analiz sağlar. Uygun testin seçimi, patojen hedefi, duyarlılık ve operasyonel verimlilik gibi tanı önceliklerine bağlıdır.

2.5.Validasyon

Laboratuvarda yeni kullanıma girecek testlerin validasyonu, test sonuçlarının doğruluğunu, güvenilirliğini ve uygulanabilirliğini sağlamak için önemli bir adımdır. Bu süreç, bir testin analitik performansının ilk doğrulamasından, klinik performansın değerlendirilmesine ve sürekli kalite izlemine kadar birden fazla aşamayı içerir ve laboratuvarda geliştirilen testler (*LDT, laboratory developed tests*) ve ticari olarak

temin edilebilen analizler için de önemlidir. Yeni bir test veya test sistemi, rutin bir tanı laboratuvarında uygulanmadan önce verifikasyon veya validasyon çalışmalarından geçmelidir. Laboratuvar tarafından 24 Nisan 2003 tarihinden önce kullanılan testler için verifikasyon ve validasyon çalışmaları gerekli değildir; ancak bu tarihten sonra uygulamaya konulan testler için yapılması zorunludur (74). Çalışmalarda kullanılan özellikle laboratuvarda geliştirilen testlerde ve henüz valide olmamış ticari kitlerde performans objektif olarak değerlendirilmelidir. Bu standardizayonun getirilmesi için çeşitli kılavuzlar yayınlanmıştır (75–77).

İyi bilimsel uygulamanın temel gerekliliklerine ek olarak, ABD'deki *FDA* (*UnitedStates food and drug administration, FDA*, tıbbi cihazların kontrolü ve denetimi yoluyla halk sağlığını korumaktan sorumlu bir Federal kurumdur. FDA, *CLIA'yı* geliştirmek ve uygulamaktan sorumlu kurumlardan biridir) ve *CLIA (United States clinical laboratory improvement amendments*, bu kuruluş kaliteli laboratuvar testlerini garanti altına almak için bir düzenleyici kurum veya programdır) gereklilikleri ve Avrupa'daki IVD Yönetmelikleri ((AB) 2017/7462017 gibi), analizlerin belirli standartlara göre doğrulanmasını gerektiren bir dizi düzenleyici kurum vardır. Ayrıca sağlık kuruluşlarının ISO 15189 standardına göre (*ISO; International Organization for Standardization*) akredite olması zorunluluğu da vardır. Avrupa'da laboratuvarda geliştirilen kitlerin CE (Conformité Européenne (Avrupa Uygunluğu)) işaretlemesi alması da gerekmektedir (78–80).

FDA tarafından onaylanan veya izni verilen analizler “in vitro tanı amaçlı” olarak etiketlenir. Ticari analizler tipik olarak CE işaretli veya FDA onaylı olmasına rağmen bu işaretlere sahip olmaları, testin tüm uygulamalar için mutlaka valide edildiği anlamına gelmez. Ayrıca, test, ticari firmanın laboratuvarında kabul edilebilir düzeyde performans gösterse de, tüm laboratuvarların kontaminasyonu azaltmak için tavsiye edilen ayrı çalışma alanlarına sahip olmayabileceği personel yeterlilikleri ve iş akışı sistemleri gibi bir takım faktörler testin performansını etkileyebilir. Soğutuculardan pipetlere, termal döngüleyicilerden ekstraksiyon sistemlerine kadar cihaz, sarf ve yöntem farklılıkları, testi temelden etkileyebilir. Bu nedenle laboratuvarların belirtilen kriterleri doğrulaması gerekmektedir. Bir örnek olarak İngiltere' de laboratuvarların yeni tanıtılan ticari analizleri değerlendirmesi için resmi bir gereklilik olmamasına rağmen, ABD'de FDA onaylı, FDA tarafından değiştirilmiş

(üreticinin talimatlarından değiştirilmiş ancak kullanıcı laboratuvarı tarafından belirlenen performans özelliklerine sahip, CLIA gereklilikleri ile tutarlı testler) ve LDT'ler, testi klinik laboratuvara sunmadan önce doğrulama gerektirir. CLIA, FDA onaylı bir testin uygulanmasından önce laboratuvarların üreticinin performans özelliklerini doğrulaması gerektiğini şart koşmaktadır. FDA tarafından değiştirilmiş bir testin veya LDT'nin uygulamaya konulacağı durumlarda CLIA, ayrıca analitik duyarlılığın ve özgüllüğün de oluşturulması gerektiğini şart koşar (81,82).

Süreç, bir validasyon planının geliştirilmesiyle başlar ve örneğin epidemiyolojik çalışmalar, enfeksiyon kontrolü veya tarama gibi test için klinik ihtiyaca dayalı kararları içerir. Daha önce tartışıldığı gibi, ticari veya LDT'leri tanıtırken laboratuvarların gerçekleştirdiği doğrulama seviyeleri arasında farklılıklar vardır. En azından, ticari bir testi valide eden bir laboratuvar, üreticinin performans iddialarının doğruluğunu belirlemelidir. Ticari olarak temin edilebilen bir IVD-CE etiketli test veya test sistemi için, üretici, testin belirtilen performansı sağlamasından sorumludur. Ancak, kullanıcı, doğruluk (*accuracy*) ve kesinlik (*precision*) gibi performans özelliklerinin laboratuvarda sağlandığını doğrulamalıdır. Doğruluk (ya da yeni terminolojiye göre "*trueness*"), ölçülen veya hesaplanan bir değerin gerçek (doğru) değere ne kadar uyum gösterdiği olarak tanımlanır ve referans materyallerin analizi veya sonuçların bir referans yöntem ile elde edilenlerle karşılaştırılması yoluyla tahmin edilir. Bu iki yöntem, doğruluğun sağlanması için kabul edilen tek yaklaşımlardır. Kesinlik, bir testin bireysel sonuçlarının tek bir çalışmadaki (çalışma içi kesinliği) ve farklı çalışmalar arasındaki (çalışmalar arası kesinliği) uyum seviyesi olarak tanımlanır. Kesinlik genellikle ölçümlerin standart sapması ve bağıl standart varyasyonu (varyasyon katsayısı) ile karakterize edilir. Nicel bir test veya test sistemi durumunda, doğrusallık (lineerlik) ayrıca değerlendirilmelidir. Doğrusallık, kantitasyonun lineer aralığının belirlenmesi olarak tanımlanır. Doğrusallık çalışmaları için elde edilen veriler, ideal regresyon katsayısının 1 olduğu bir lineer regresyon analizine tabi tutulmalıdır (75).

Bir testin performans özellikleri karşılandıktan sonra, ister ticari ister laboratuvar tarafından geliştirilmiş kit olsun, doğrulama çalışması günlük olarak devam etmelidir. Bu, testin doğrulama durumunun korunduğundan emin olmak için iç ve dış pozitif kontrol seviyelerinin sürekli olarak izlenmesini içerir.

İlk adım, testin amacını tanımlamaktır; doğrulama sürecindeki tüm sonraki adımlar bu karar tarafından yönlendirilir. Bu aşamada, bir testin performansını etkileyebilecek aşağıdaki üç değişken dikkate alınmalıdır:

(1) Numune türü ve testin kalitatif veya kantitatif olması

(2) Test sistemi: Testin belirli örnek türünde hedefi tespit etme yeteneğini etkileyen biyolojik, teknik ve operatörel faktörler.

(3) Sonuç: Sonuç, tespit edilen analit açısından bir bireyin veya popülasyonun durumunu doğru bir şekilde tahmin etme gücü.

Örnek türü (örneğin doku, tam kan, nazofarengeal swab, BOS vs) PCR'deki polimeraz aktivitesini etkileyen inhibitörler içerebilir. Bu nedenle, ekstraksiyon işleminin değerlendirilmesi ve gerekli alternatiflerin göz önünde bulundurulması gerekir. Kantitasyon analizleri, patojen yükünün tedavi sırasında izlenebildiği hastaların yönetiminde faydalıdır. EBV ve CMV gibi bazı viral patojenler, birincil düşük seviyeli latent enfeksiyonlar oluşturabilir ve ileride yeniden aktive olarak üretken litik enfeksiyona dönüşebilir. Bir diğer önemli faktör, doğrulamayı mümkün kılmak için yeterli sayıda iyi karakterize edilmiş pozitif kontrol örneğinin bulunmasıdır. Nesnelliği korumak için, tutarsız sonuçları çözmek için seçilen yöntem, test başlamadan önce validasyon planının bir parçası olarak belirlenmelidir (83–85).

Kit için bir kalite güvence planı oluşturulmalıdır. Ayrıca kalite kontrol reaktiflerinin bulunabilirliği de dikkate alınmalıdır. Bu, kalite kontrol panellerinin bulunma olasılığının düşük olduğu nadir patojenleri hedefleyen yeni denemelerde veya kantitasyonuna gerek olmayan solunum yolu virüsleri gibi patojenlerde kantitatif standartların bulunmadığı durumlarda bir sorun olabilir; laboratuvarların uygun kalite kontrolleri üretmek için kendileri stratejiler geliştirmeleri gerekebilir (86).

2.5.1. Validasyon Planı

Validasyon planı çıkarılmadan önce 2 terimin iyi bilinmesi gerekmektedir: verifikasyon ve validasyon.

- Verifikasyon: Hem FDA hem de ISO, "verifikasyon" terimini geniş bir şekilde, "birtakım gerekliliklerin yerine getirildiğinin objektif kanıtlar ortaya konarak teyit edilmesi" olarak tanımlar (87,88). CLIA, "verifikasyon" terimini özellikle, bir testin prospektüsüne uygun olarak kullanıldığında, testi kullanan laboratuvarın üreticinin performans iddialarını tekrarlayabileceğini teyit etmek için kullanır. Doğruluk

(accuracy), kesinlik (çalışma içi ve çalışmalar arası), linearite (kantitatif bir testse) deneylerini içerir.

- Validasyon: Tamamlanan analizin tanımlanmış çalışma koşulları altında kullanıcıların ihtiyaçlarına, gereksinimlerine ve/veya özelliklerine uygun olmasını sağlama süreci. Dünya Sağlık Örgütü (*WHO*), validasyonu, "bir prosedürün, sürecin, sistem ekipmanının veya kullanılan yöntemin beklendiği gibi çalıştığını ve amaçlanan sonucu elde ettiğini kanıtlama eylemi (veya süreci)" olarak tanımlar (89,90). Verifikasyon deneylerine ek olarak analitik duyarlılık ve özgüllük deneylerini gerektirir (75,91).

Bir analizin laboratuvarda kullanımı boyunca sürekli olarak izlenmesi gereken çok sayıda yönü vardır. Mikroorganizmalar, özellikle virüsler sıklıkla mutasyona uğrar. Bu, PCR'nin verimliliğinin olası yanlış negatif sonuçlar açısından izlenmesi gerektiği anlamına gelir, çünkü bu, primerlerin ve/veya probun güncellenmesi ve yeniden doğrulanması gerektiğinin ilk işareti olabilir. Üreticiler sürekli olarak yeni tamponlar, enzimler ve ekstraksiyon kitleri geliştirir, bunlar değerlendirilmeli ve uygun görülürse yeniden valide edilmeli ve analiz yeniden doğrulanmalıdır. Sürekli olarak yeni tipte problar tanıtılmaktadır ve bunların da analizin performansını korumak veya iyileştirmek için test edilmesi gerekir.

Her yeni test için standart olan validasyon basamakları, özgüllük, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik kriterleridir. Validasyon yapacak tüm laboratuvarlar için kapsamlı yönergelerin izlenmesi çok önemlidir (77).

Referans Materyalleri ve Örnek Sayıları

Genel olarak, referans materyaller, hasta örnekleri veya havuzlanmış serumlar bir doğrulama veya geçerlilik deneyinde kalibratör olarak kullanılabilir. Hasta örnekleri veya havuzlanmış serumlar kullanıldığında, bunların mümkünse mevcut altın standart yöntemle daha önce test edilmiş olması gerekir. Özellikle nadir ve yeni ortaya çıkan bulaşıcı hastalık patojenleri için bir LDT geliştirirken ortaya çıkan ilk soru, örneklerin bulunabilirliğidir. Yeterli örnek yoksa, başka bir yerden elde edilebilir mi? Değilse, uygun bir matrise çeşitli analit konsantrasyonları ekleyerek test örnekleri oluşturmak gerekebilir. Uygun örneklerin diğer kaynakları diğer klinik/araştırma

laboratuvarları veya ticari standartlar, kalite kontrol materyalleri olabilir. Validasyon ve verifikasyon süreçlerinde kalibratörler; pozitif kontroller, düşük pozitif kontroller ve negatif kontroller olarak üç sınıfta kullanılır. Nükleik asit testleri için pozitif kontroller, test veya test sistemi için linearite üst limiti içerisindeki saptama alt sınırının 1 log10'dan fazla üzerindeki bir değer olarak tanımlanır. Düşük pozitif kontroller ise, linearite üst limiti içerisindeki saptama alt sınırının 1 log10'a kadar üzerindeki bir değer olarak tanımlanır (75). Tipik olarak, 50-80 pozitif/düşük pozitif ve 20-50 negatif örnekten oluşan 100 örnek kullanılır (92). Ayrıca, test edilen örneklerde bulunması muhtemel potansiyel inhibitör maddelere de dikkat edilmelidir. Bu nedenle, bilinen inhibitörlerle ve inhibitörler olmadan, uygun negatif örneklere düşük konsantrasyonlarda analit eklenerek karıştırılmış kontrol örnekleri hazırlanmalıdır. Ancak, bu tür yapay olarak oluşturulmuş örneklerin klinik örneklerle aynı özelliklere sahip olması olası değildir. Bu nedenle, yeterli sayıda gerçek örnek mevcut olduğunda, analiz ve ekstraksiyon yöntemlerinin yeniden değerlendirilmesi gerekecektir. Örnekler mevcut olduğunda, birden fazla örnek türü gerekebilir, örneğin solunum patojenleri nazofaringeal aspiratlardan, bronkoalveolar lavajlardan veya burun ve boğaz sürüntülerinden tanımlanabilir. Değerlendirilecek örnek türünü ve belirlenen her örnek türü için en etkili ekstraksiyon yöntemini belirlemek için her zaman bir literatür araştırması yapılmalıdır (93).

Yeterli sayıda örnek mevcut olduğunda, sayıların hesaplanması gerekir. İdeal olarak bu, istatistiksel analizlerle belirlenmelidir. Burada, önemli bir farkı tespit etmek için gereken örneklem büyüklüğü, geliştirilmekte olan testte kullanılan eşleştirilmiş örneklerin ortalamaları ile altın standart karşılaştırıcı arasındaki farktan standart sapma ile belirlenir. Bu yöntem, tanısal duyarlılık ve özgüllükte %2 veya %5 hesaplanmış hataya izin verir. Bu nedenle, örneğin, %2 hata varsayılırsa, %99 güven ve %99 tahmini duyarlılık/özgüllüğe sahip bir deney için gereken örnek sayısı 164'tür. Ancak, aynı deney %95 tahmini duyarlılık/özgüllüğe ulaşırsa, yüksek güven (%99) elde etmek için gereken örnek sayısı 788 olur (92).

Nükleik asit testleri temelde birkaç kontrol içerir. Pozitif kontrol, negatif kontrol (negatif *template* kontrolü), ekstraksiyon kontrolü (EC, tam viriyon, genelde hedef olmayan bir virüs ya da bakteri), amplifikasyon kontrolü (IC, çıplak nükleik asit) bu kontrollerdir. Laboratuvarda geliştirilen nükleik asit testlerinde bu kontrollerin hepsi

muhakkak olmalıdır. Bu tip testlerde optimizasyon basamaklarında kullanılacak primer/probların tasarımında in-silico analiz gerekir. Primer/problar hazırlandıktan sonra diğer *master mix* içerikleri ($MgCl_2$, dNTP, DNA polimeraz konsantrasyonları vs) ile etkinlikleri ve konsantrasyonları optimize edilmelidir.

Doğrusal Dinamik Aralık (Linear Dynamic range)

Bir reaksiyonun lineer olduğu dinamik aralık (kalibrasyon eğrisi aracılığıyla belirlenen en yüksekten en düşük ölçülebilir kopya sayısına kadar) tanımlanmalıdır. Lineer dinamik aralık kantitatif testler için elzemdir, fakat kalitatif testlerde lineerite, kesinliğin ne kadar güçlü olduğunu gösterdiği için Ct üzerinden gösterilebilir (76,92). Kalibrasyon eğrilerini oluşturmak için kullanılan şablona (*template*) bağlı olarak, dinamik aralık ideal olarak 5 veya 6 log10 konsantrasyonlarına kadar uzanmalıdır. Kalibrasyon eğrisinin lineer aralığı, nicelendirilen hedef nükleik asitlerin aralığını içermelidir. Alt nicelendirme sınırları genellikle belirsiz olduğu için, lineer aralık içinde olduğu iddia edilen en düşük konsantrasyondaki varyasyon belirlenmelidir. Korelasyon katsayıları (r^2 değerleri) raporlanmalı ve ideal olarak, tüm lineer dinamik aralık boyunca güven aralıkları (CI'lar) sağlanmalıdır.

LOD (Limit of Detection-Tespit Sınırı)

Pozitif örneklerin %95'inin tespit edildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Analitik duyarlılık genellikle 'saptama sınırı' (LOD) olarak adlandırılır. Başka bir deyişle, LOD'deki konsantrasyonlarda hedef nükleik asit içeren bir grup tekrarlı deneyde, başarısız reaksiyonların oranı %5'ten fazla olmamalıdır. LOD, rutin laboratuvar koşullarında ve tanımlanmış bir örnek türünde kabul edilebilir bir kesinlikle (ör. test edilen örneklerin %95'inden fazlasında) tutarlı bir şekilde tespit edilebilen bir örnekteki analit maddesinin en düşük gerçek konsantrasyonudur, ancak bu her zaman miktarının ölçülebildiği anlamına gelmez (94). LOD hem nicel hem de nitel testler için belirlenmesi gereken önemli bir performans özelliğidir. LOD, genellikle konsantrasyon (moleküler testler için kopya/mL veya kopya/µg DNA) olarak ifade edilir. Tespit edilebilir analit konsantrasyonu ne kadar düşükse, testin analitik duyarlılığı o kadar yüksektir. Düşük konsantrasyon sınırındaki analitik

performans, moleküler enfeksiyon hastalıkları testlerinde büyük önem taşır, çünkü bu, hastalığın teşhis edilme ve tedavi sınırlarının belirlenme yeteneğini tanımlar.

Analitik duyarlılık, bir testin doğal bir özelliğidir ve testin tanısal veya klinik duyarlılığından oldukça farklıdır. Tanısal duyarlılık, yalnızca bir testin bir popülasyondaki bir durum veya hastalığı tespit etmek için kullanıldığında önem kazanır. Tanısal duyarlılık, belirli bir bozukluğu olan bireylerin test tarafından pozitif olarak tanımlanma oranı veya yüzdesi olarak tanımlanır (95). Yüksek analitik duyarlılığa sahip bir testin mutlaka kabul edilebilir tanısal duyarlılığa sahip olması gerekmez. Mükemmel analitik duyarlılığı olan bir test, örnek toplama veya işleme ile ilgili problemler nedeniyle işlenmiş örnekte hedef madde bulunmuyorsa pozitif sonuç veremeyebilir. Buna karşılık, sıfıra yaklaşan çok düşük konsantrasyonlara klinik bir ihtiyaç veya ilgi olmayabilir (özellikle latent virüslerde). LOD'un belirlenmesi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. LOD genellikle iki yoldan biriyle belirlenir: İstatistiksel yöntem, sinyalin arka plan gürültüsünden ayırt edilebileceği noktanın hesaplanması ve ampirik yöntem, bilinen konsantrasyonlardaki hedef maddeyi içeren örneklerin analiz aralığında test edilmesi (96). Moleküler testlerin tıbbi uygulamaları için genellikle ampirik yöntem, algılama sınırını tahmin etmek için daha yararlıdır.

LOD'u ampirik olarak belirlerken, düşük konsantrasyona sahip örneklerden tekrarlı ölçümler alınır. Bu deneyler, tipik laboratuvar koşullarında testin performansını yansıtacak şekilde birkaç güne (ör. beş gün) yayılmalıdır ancak reaktif partiler değişmemelidir (96). Çoklu testlerde (multipleks testler), LOD her bir analit için ayrı ayrı belirlenmelidir (89).

LOD'un belirlenmesinde, analitin gerçek ya da kabul edilmiş değerlerine sahip, iyi karakterize edilmiş örneklerin kullanılması gereklidir. Karakterize edilmiş örnekler arasında bilinen miktarlarda hedef içeren hücre hatları, standartlar, kalite kontrol materyalleri, yeterlilik testi örnekleri veya kabul edilebilir bir yöntemle test edilmiş hasta örnekleri yer alır.

Fazla örnek ile fazla ölçüm yapılmasının, belirsizliklerin azalmasıyla daha iyi tahminler sağladığı açıktır. Ancak, moleküler testlerin validasyonunda, örneklerin sayısı genellikle örnek teminindeki kısıtlamalar ve bütçe endişeleriyle sınırlı olabilir. Literatürde, dilüsyon çalışmalarıyla belirlenen olası LOD'un üzerinde, altında ve LoD değerinde 20 ölçüm yapılması yeterli görülmektedir (97). CLSI, üreticinin performans

iddiasını doğrulamak için 20 ölçüm yapılmasını önermekte ancak bir üreticinin bir LOD iddiasını oluşturabilmesi için minimum 60 veri noktasını (örneğin, her birinden 12 ölçüm alınmış beş örnek) denemesi gerekmektedir (14). Numune sayısı elbette LoD belirlenirken kullanılacak analiz yöntemi ile de ilişkilidir. LoD, *limit of blank* (*LoB*, hedef analiti içermeyen örnek sinyal limiti) üzerinden belli bir formül ile hesaplanabilmektedir: ($LoB=mean_{blank}+1.645xSD_{blank}$) ($LoD=LoB+1.645xSD_{düşük\text{-}konsantrasyonlu\ örnek}$). Fakat çoğu test sisteminde LoB, kesme çizgisinin altında kaldığı için ölçülmemekte ve negatif olarak raporlanmaktadır.

Probit analizi, moleküler testlerde güvenilir şekilde, tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonunu ampirik olarak belirlerken yaygın olarak kullanılan bir regresyon analizidir ((98–101)). Probit analizi, pozitif/negatif sonuç alınan kalitatif testlerde ve her bir konsantrasyonda test edilen tekrar sayısı az olduğunda biyolojik uç noktaları güvenilir bir şekilde tahmin etmek için kullanılır. Test edilen her konsantrasyon için en az üç tekrar gereklidir, ancak her konsantrasyonda 10 veya daha fazla tekrar gibi büyük örneklem boyutları küçük örneklem boyutlarından daha iyidir. Konsantrasyonlar seri dilüe edilmek zorunda değildir, genel olarak düşük konsantrasyona sahip en az 5 örnek seçilerek en az 8 tekrar olacak şekilde çalışılır. Her konsantrasyon için aynı sayıda tekrar gerekli değildir (76).

Probit analizi, konsantrasyona bağlı tepki eğrisini düz bir çizgiye dönüştürür ve bu çizgi daha sonra en küçük kareler veya maksimum olabilirlik yöntemlerini kullanarak regresyonla analiz edilir. Çoğu bilgisayarlı istatistiksel paket maksimum olabilirlik yöntemini kullanır ve bu daha kesin kabul edilir. Probit analizi, SPSS, Microsoft Excel için Analyze-it eklentisi, MiniTab ve Statgraphics gibi ticari olarak mevcut istatistiksel yazılımlarda mevcuttur.

Farklı analit konsantrasyonlarını karşılaştırmak için çeşitli uç noktalar kullanılabilir, ancak algılama sınırı çalışmalarında genellikle %95 uç noktası (C95) en yaygın olarak kullanılır. C95, o konsantrasyondaki analiti içeren örneklerin %95'inin pozitif sonuç verdiği konsantrasyonu temsil eder (98).

Analitik Özgüllük

Bir testin analitik özgüllüğü, tanısal özgüllüğünden farklıdır. Tanısal özgüllük, belirli bir hastalığa sahip olmayan ve test sonucunda hastalık açısından negatif olarak

tanımlanan kişilerin yüzdesini ifade eder. Yani bir nevi testin negatifleri ayırma gücüdür. Analitik özgüllüğü çok yüksek olan bir testin tanısal özgüllüğü düşük olabilir. Hastadan örneğin doğru yerden doğru zamanda alınması, laboratuvara uygun şartlarda taşınması gibi preanalitik süreçler tanısal özgüllüğü etkiler. Ayrıca yanlış pozitif sonuçlar, genetik olarak benzer organizmalar veya kontaminantlar tarafından da tetiklenebilir. (102). Analitik özgüllük, testin yalnızca hedeflediği analiti tespit etme ve hedefin miktarının, kontaminant nükleik asitler ya da numune ile ilgili koşullar nedeniyle etkilenmediğini gösterme yeteneğini ifade eder. Analitik özgüllüğün iki yönü vardır: çapraz reaksiyon (cross-reactivity) ve interferans.

Çapraz reaksiyonu dışlamak için, test hedefine benzer genetik yapıya sahip mikroorganizmalar, numunede eş zamanlı bulunabilecek normal flora elemanları ve ko-infeksiyon yapabilen mikroorganizmalar test tarafından çalışılmalıdır.

İnterferansa sebep olabilen maddeler ise, varlığı durumunda testin etkinliğini azaltabilecek maddeler olarak ifade edilir. PCR testlerinde etkilenebilecek en önemli bileşen, polimeraz enzimidir. İnterferansa neden olabilecek maddeler önceden belirlenmeli ve interferansların varlığında test etkinliği ölçülmelidir (76).

Kesinlik

Kesinlik (*precision*) terimi, bir testin, aynı homojen örneğin birden fazla dilüsyonuna tekrar tekrar uygulandığında ne kadar iyi şekilde tekrarlanabilir ölçüm sağladığını ifade eder (43). Kesinlik, “belirlenmiş koşullarda elde edilen bağımsız ölçüm sonuçları arasındaki uyum yakınlığı” şeklinde tanımlanır. Bir ölçümün çok kesin (tekrarlar aynı sonucu verir) ancak çok doğru olmayabileceği (gerçek değer oldukça farklı olabilir) unutulmamalıdır. İdeal bir test hem kesin hem de doğru (*accurate*) olmalıdır. Kesinlik (rastgele analitik hata olarak da adlandırılır), testin normal çalışması sırasında değişen faktörlerden (pipet, sıcaklık, çalışma süresi, tekniker deneyimi vs) kaynaklanan rastgele hatalarla ilişkilidir. Kesinlik sayısal bir değerle ifade edilmez, niteliksel olarak yüksek, orta veya düşük olarak belirtilebilir. Sayısal ifade için "kesinsizlik" (*imprecision*) terimi kullanılır. Kesinsizlik, “belirtilen koşullar altında elde edilen ölçüm sonuçlarının dağılımı” olarak tanımlanır (103). Kesinsizliğin 2 bileşeni vardır: tekrarlanabilirlik (çalışma içi) ve tekrar üretilebilirlik (günler arası, farklı teknikerler, farklı kit lotları ya da farklı laboratuvarlarda yapılan

test sonuçları karşılaştırması) (104). Kesinsizliğin analizinde en ideali 20 gün boyunca toplam 40 tekrar olacak şekilde çalışmayı sürdürmektir. Fakat bu maliyet açısından her zaman mümkün olmayacağı için rehberlerde özellikle düşük konsantrasyonlarda (kesinsizlik çalışması yüksek konsantrasyonlarda anlamlı değildir) seçilen örneklerin (kalitatif nükleik asit testlerinde 1 düşük pozitif, 1 pozitif örnek yeterli) 3 tekrarlı çalışılması da yeterli kabul edilmektedir (75). Fakat tekrar sayısı düştükçe istatistiksel gücün de düşeceği unutulmamalıdır. Kesinsizliğin en iyi göstergesi ise laboratuvarlar arası çalışılmasıdır (105)Kesinsizlik genellikle ölçümlerin standart sapması (SD) ve bağıl standart sapma (varyasyon katsayısı, CV) cinsinden ifade edilir. Mevcut kılavuz, ortalama değer etrafındaki hassasiyetin CV'nin %15'ini geçmemesi gerektiğini önermektedir (106).

Doğruluk

Doğruluk, genellikle yeni bir test yönteminin karşılaştırmalı veya referans bir yöntemle ne kadar uyumlu olduğunu tanımlamak için kullanılan geniş bir terimdir. Doğruluk, tek bir ölçüm sonucunun analitin gerçek değeriyle olan uyumuna yakınlığını ifade eder (107). Doğruluk (*accuracy*) terimi yeni terminolojide "gerçeklik (*trueness)*" olarak adlandırılmakadır. Gerçeklik, çok sayıda ölçümden elde edilen ortalama değer ile ölçülebilir bir büyüklüğün uluslararası standart varsa gerçek değeri, yoksa kabul edilen referans değeri arasındaki uyumun yakınlığını ifade etmek için kullanılmaktadır. Gerçeklik, sayısal olarak yanlılık (*bias*) ile ifade edilir. Yanlılık, gerçeklikle ters orantılıdır ve bağımsız değişkenle ilgisi olmayan bir faktörün neden olduğu rastgele olmayan etkiler nedeniyle gerçek değerden sapma miktarını ifade eder (108).

Gerçekliği değerlendirmek için iki ana yaklaşım tanımlanmıştır. Biri yöntem karşılaştırma çalışmasıdır. Değerlendirilmekte olan yöntemle ve karşılaştırmalı bir yöntemle elde edilen sonuçların analiz edildiği bir bölünmüş örnek deneyidir. Diğer yaklaşım ise geri kazanım çalışmasıdır. Yeterlilik testi örneklerini veya diğer analiz edilmiş materyalleri kullanır ve sonuçları değerlendirilen yöntemle beklenen referans değerle karşılaştırır. Laboratuvarlar, numune erişilebilirliğine bağlı olarak bu yaklaşımlardan birini veya her ikisini seçebilir (109,110). Çalışma boyunca reaktif lotları değiştirilmez. Çoklu testlerde (*multiplex* testler) gerçekliği değerlendirmek bazı

özgün zorluklar içerir. Çoklu testteki tüm analitleri kapsayan bir yöntem yoksa, birden fazla karşılaştırmalı yöntem kullanılması gerekebilir. Ayrıca, her bir analit düzeyinde ve genel çoklu test sistemi düzeyinde gerçekliği belirlemek için uygun veri analiz yöntemini seçmek de bir başka zorluktur (89).

Bir yöntem (kit) karşılaştırma çalışmasında, örnekler hem yeni testle hem de geçerli bir karşılaştırmalı yöntemle paralel olarak test edilir. Yöntem karşılaştırma çalışmasında kullanılan numuneler genellikle laboratuvarda veya klinik laboratuvarın kullandığı referans laboratuvarda mevcut yöntemle daha önce test edilmiş hasta numuneleridir. Numuneler ayrıca testin klinik olarak anlamlı aralığına yayılmalı ve hem pozitif hem de negatif numuneleri içermelidir. Karşılaştırmalı yöntem olarak, laboratuvarın mevcut yöntemi veya tanınmış bir referans yöntem kullanılabilir. Eğer karşılaştırmalı yöntem bir referans yöntemse, teorik olarak analitin gerçek değeri bilinir. Eğer karşılaştırmalı yöntem referans yöntemi değilse, yalnızca kabul edilen bir referans değeri bilinir ve bu, pratikte belirlenebilecek gerçek değer olarak kabul edilebilir. Örneklerin hem karşılaştırmalı hem de test prosedürleriyle çift olarak test edilmesi önerilir, böylece üretilen veriler iyi tanımlanmış örnekleri temsil eder. Eğer laboratuvar, karşılaştırmalı yöntemle test yöntemi arasında yakın bir uyum bekliyorsa, her örnek tek olarak test edilebilir (109). Yöntem karşılaştırma çalışmasında test edilecek numune sayısı, çalışmayı yürüten laboratuvar tarafından belirlenir. Uygun numune sayısı, testin kesinliği ve karmaşıklığı, hedeflerin belirtilen popülasyondaki prevalansı, referans yönteminin doğruluğu, maliyet ve uygulanabilirlik, veri analizi için kullanılan yöntem ve kullanıcının kabul etmeye hazır olduğu istatistiksel güven düzeyi gibi birçok faktöre bağlıdır (89). En az 20, genellikle 40-50 veya daha fazla numunenin test edilmesi önerilir (111). Üreticiler için minimum 100 numune önerilmektedir. Nitel testler için, başlangıç çalışması kapsamında 50 pozitif ve 50 negatif numune önerilmektedir (110). Eğer sonuçta elde edilen güven aralığı kabul edilemeyecek kadar genişse, daha dar bir güven aralığı elde etmek için daha fazla numune test edilebilir. Laboratuvarda geliştirilen moleküler testler için 50 pozitif ve 100 negatif numune önerilmektedir (111).

Valide edilen kit için karşılaştırmalı bir yöntem yoksa, bir geri kazanım deneyi gerçekliği değerlendirmek için tek pratik yoldur (97,111). Geri kazanım çalışmaları, belirli bir numune matrisinde bilinen bir miktar analit bulunduğunda testin bu analiti

ölçüp ölçemeyeceğini test eder. Geri kazanım çalışmaları için numuneler; standartlar, kalite kontrol materyalleri, yeterlilik testi materyalleri veya bilinen ya da üzerinde uzlaşılmış değerlere sahip hasta numunelerini içerebilir. Test için numuneler, negatif hasta örneklerine bilinen miktarlarda analit eklenerek oluşturulabilir. Daha sonra numuneden geri kazanılan analit miktarı, numuneye eklenen miktarla karşılaştırılır.

Gerçeklik analizi sonucu üç şekilde sonuçlanır, eşdeğer yöntemler (tüm sonuçlar aynı), değiştirilebilirlik (*commutability*) ve uyumsuz. Pratikte yöntemlerin vereceği sonuçlar aynı olamayacağı için en ideal tanım değiştirilebilirliktir. İki testin değiştirilebilir olup olmadığını belirlemek için niceliksel farkların büyüklüğü belirlenmelidir. Fark klinik olarak önemli olacak kadar yeterli değilse, yeni testin tıbbi tolerans aralığında olduğu kabul edilir ve eski testin yerini alabilir. Değiştirilebilir testler, hastalar için tanı gücünde kayıp olmadan değiştirilebilir. Uyumsuz yöntemler, tıbbi tolerans aralığından daha büyük farklılıklara sahiptir ve değiştirilemez. Verilerin görsel olarak ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi faydalıdır. Güncel kılavuzlar, yöntem karşılaştırma verilerinin değerlendirilmesi için bir korelasyon ve regresyon analizi ile bir fark grafiğinin (%95 güven aralıklarının hesaplanmasıyla) kullanılmasını önermektedir (111,112). Bu amaçla iki grafik kullanılır, biri dağılım grafiğidir ve bu grafik sabit veya orantısal yanlılığı ortaya çıkarır. Bir diğeri ise fark grafiğidir ve bu yanlılığın tüm değer aralığında sabit olup olmadığını veya yöntemler arası farklılıklardan etkilenip etkilenmediğini gösterir.

Dağılım grafiğinde, test yönteminin tekrarlı ölçümlerinin ortalaması y ekseninde, karşılaştırmalı yöntemin tekrarlı ölçümlerinin ortalaması x ekseninde olacak şekilde çizilir. Regresyon eğim çizgisi eklendikten sonya y eksenini kesim değeri ve eğim çizgisi eklenir. Burdan PCR verimliliği de daha önce tanımlanmış formüllerden hesaplanabilir (113).

Fark grafiğinde benimsenen yöntem Bland-Altman fark grafiğidir. İki test arasındaki uyumu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. %95 uyum sınırları, geleneksel olarak farkın ±1.96SD'si olarak belirtilir (ortalama fark ± farkların 1.96 standart sapması). Eğer %95 güven aralığı sıfırı içeriyorsa, istatistiksel olarak yanlılık olmadığı kabul edilir. Ancak, kabul edilebilirlik kriterleri belirlenirken, istatistiksel anlamlılık kadar klinik anlamlılık da göz önünde bulundurulmalıdır (114).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Araştırmanın Tipi

Araştırma metodolojik bir çalışmadır.

3.2.Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Tablo 2. Araştırmanın Plan Çizelgesi

Literatür Taraması
▼
Literatürlere Dayalı Çalışma Yönteminin Belirlenmesi
▼
Örneklerin hazırlanması ve nükleik asit ekstraksiyonu/SC2 Validasyon
▼
TÜBİTAK 1002-b Proje Yazımı
▼
TUBİTAK 1002-b Proje Kabulü ve dPCR Çalışması/InfA&b RSV LoD ve Tekrarlanabilirlik, Kit Karşılaştırma Çalışması
▼
TÜBİTAK 1002-B Proje raporunun tamamlanıp yüklenmesi ve makale yazımı
▼
Tezin Yazımı

3.3.Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

2017-2022 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalardan rutin solunum virüs paneli testi için alınmış nazofarengeal sürüntü örnekleri çalışmanın evrenidir. Örnekler viral nükleik asit transport medium (vNAT) içerisinde laboratuvara taşınmıştır. Hasta numuneleri ve QCMD örnekleri çalışıldıktan

sonra – 80 ^{0}C’ de saklanmıştır. PCR sonucuna erişilebilen tüm pozitif ve negatif örnekler çalışmaya dahil edilerek örneklem hazırlanmıştır.

3.4.Çalışma Materyali

Çalışmada, SARS-CoV-2 (SC2) ile ilişkili parametrelerin değerlendirilmesi, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) uluslararası standardına göre kalibre edilmiş QCMD (www.qcmd.org) ve MOTAKK (www.motakk.org) dış kalite kontrol (EQA) panel örnekleri kullanılarak gerçekleştirildi. Deneyler, virüsün hem Alfa hem de Omicron varyantları kullanılarak gerçekleştirildi.

İnfluenza A (InfA), influenza B (InfB) ve RSV performans analizlerinde kullanım için kantitatif standartlar, bilinen pozitif hasta örneklerinden ve QCMD materyallerinden dijital PCR (dPCR) (QIAcuity, Qiagen, Almanya) kullanılarak hazırlandı.

DEU Hastanesi'nin merkez laboratuvarında sendromik bir test (FastTrack Respiratory Pathogens 21, Siemens, Almanya) ile 20 solunum virüsü ve bir bakteri için test edilen hastalardan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri -80˚C'de saklanarak analitik özgüllük, doğruluk, kit karşılaştırması ve multipleks verimlilik çalışmaları için kullanıldı. Bu örnekler, 2017-2022 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi’ne başvuran hastalardan rutin solunum virüs paneli testi için alınmış nazofarengeal sürüntü örnekleridir. Örnekler viral nükleik asit transport medium (vNAT) içerisinde laboratuvara taşınmıştır. Hasta numuneleri ve QCMD örnekleri çalışıldıktan sonra – 80 ^{0}C’ de saklanmıştır. PCR sonucuna erişilebilen tüm pozitif ve negatif örnekler çalışmaya dahil edilmiştir.

3.5.Araştırmanın Değişkenleri

Bu çalışmada bağımlı değişkenler, Diagnovital® multipleks qRT-PCR testinin tanı oranları, Ct (döngü eşiği) değerleri ile analitik duyarlılık, özgüllük, hassasiyet ve doğruluk ölçümleridir. Bu ölçümler, testin SARS-CoV-2 (Alfa ve Omicron varyantları), Influenza A, Influenza B ve RSV virüslerini tespit etmedeki performansına bağlı olarak değişir.

Bağımsız değişkenler ise; özellikle her virüsün konsantrasyonları (kopya/mL cinsinden), kullanılan örnek türleri (çeşitli solunum virüsleri için pozitif ve negatif örnekler) ve karşılaştırma için kullanılan farklı qRT-PCR kitleri gibi test yöntemleridir. Bu değişkenler, bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri gözlemlemek amacıyla değiştirilmiş veya çeşitlendirilmiştir.

3.6.Veri Toplama Araçları

3.6.1.Influenza A, influenza B ve RSV için dijital PCR ile Kantitatif Materyal Eldesi

dPCR analiz kitinin (QIAcuity® OneStep Advanced Probe Kit, Qiagen, Almanya) reaksiyon bileşenleri; 10 µl 4x OneStep Advanced Probe Master Mix, 0,4 µl 100x OneStep Advanced RT Mix, 2 µl 20x primer-prob mix, 5 µl enhancer GC ve nükleik asit konsantrasyonuna bağlı olarak değişken miktarda şablon içeriyordu. Qiagen'den influenza A (no: 11320, hedef segment 7 matris protein geni), influenza B (no: 11520, hedef segment 8 nükleer ihracat protein geni) ve RSV (no: 12814, hedef matris protein geni) için dPCR'nin primer-prob setleri kullanıldı. QIAcuity Dijital PCR Sistemi için üreticinin talimatları izlendi. Her reaksiyon karışımından 40 µl, 96 kuyulu bir plakaya aktarıldı, kapatıldı ve aşağıdaki döngü protokolü altında bir QIAcuity Termal Döngü Cihazında döngülendi: 40 dakika boyunca 50 °C ve 2 dakika boyunca 95 °C'de, ardından 5 saniye boyunca 95 °C'de ve 30 saniye boyunca 60 °C'de olmak üzere 40 döngü.

Kantitasyon için Kullanılan Örnekler

Projede kantitatif standart materyal hazırlamak için iki farklı örnek türü kullanıldı. Birincisi "*Quality Control for Molecular Diagnostics" (*QCMD) uluslararası dış kalite kontrol örnekleri, diğeri ise arşivde saklanan hasta örnekleridir. QCMD örnekleri ve hasta örnekleri tam viriyon içermektedir. Hasta örnekleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalardan rutin solunum virüs paneli testi için alınmış nazofarengeal sürüntü örnekleridir. Örnekler viral nükleik asit transport medium (vNAT) içerisinde laboratuvara taşınmıştır. Hasta numuneleri ve QCMD örnekleri çalışıldıktan sonra – 80°C' de saklandı. QCMD örnekleri direkt, hasta örnekleri havuzlanarak kullanıldı.

Deneyler için yeterli volümde örnek havuzu oluşturabilmek amacı ile influenza A için 6 farklı arşiv hasta örneği (Ct değerleri: 21.47, 19.66, 24.81, 22.45, 21.75, 24.49), Influenza B için 6 farklı arşiv hasta örneği (Ct değerleri: 23.87, 22.85, 21.18, 19.99, 21.37, 20.98), ve RSV için 7 farklı arşiv hasta örneği (Ct değerleri: 23.99, 15.35, 15.04, 17.12, 19.49, 20.81, 21.08) karıştırılarak havuzlandı. Elde edilen havuzlar qRT-PCR ile çalışılarak Ct değerleri belirlendi. Sonuç, influenza A için 22.43, influenza B için 21.7, RSV için 18.98 olarak bulundu. Çalışmada, QCMD örnekleri aynı zamanda pozitif kontrol olarak kullanıldı, negatif kontrol olarak ise nükleaz içermeyen su kullanıldı.

Ekstraksiyon

Tüm örnekler, Xi'an Tianlong Generotex96 izolasyon cihazı ve Ianlong Nucleic Acid Extraction Kit (Xi'an Tianlong Science&Technology Co, China, Lot: 21092620T014H) kullanılarak nükleik asit ekstraksiyonu yapıldı. Giriş hacmi 200 µl, elüsyon hacmi 60 µl olacak şekilde çalışıldı. Elde edilen RNA' lar dPCR ve qRT-PCR çalışmaları yapılıncaya kadar -40 ^{0}C'de saklanmıştır. Çalışmalar bir hafta içinde tamamlandı. dPCR testi öncesi, tüm örneklerin NanoPhotometer N60 (IMPLEN, Almanya) nanodrop cihazı ile nükleik asit konsantrasyonları (OD 260/280 oranı) ölçüldü. RNA'nın saflığı (>2), hem dPCR, hem de qRT-PCR validasyon işlemlerine devam edilmesinde bir seçim kriteri oldu.

Ters Transkripsiyon (RT) ve Dijital PCR

Influenza A, influenza B ve RSV için, QIAcuity® OneStep Advanced Probe Kit (Katalog No: 250131, Qiagen, Almanya) kullanılarak ters transkripsiyon (RT) ve amplifikasyon yapıldı. dPCR'da influenza A (11320) için DMA00373 katalog numaralı (hedef gen: segment 7 matris protein geni), influenza B (11520) için DMA00374 katalog numaralı (hedef gen: segment 8 nükleer eksport proteini (NEP) geni), RSV (12814) için DMA00379 katalog numaralı (hedef gen: matriks protein geni) primer/prob setleri (Qiagen, Almanya) kullanıldı. dPCR için QIAcuity (Qiagen, Almanya) çip bazlı cihaz kullanılmıştır. İşlemler üreticinin belirlediği protokole uyularak gerçekleştirildi. Tablo 3'de dPCR için kullanılan reaktifler ve miktarları, Tablo 4' de dPCR sisteminin çalışma basamakları verilmiştir.

Tablo 3. Dijital PCR yönteminde kullanılan reaktifler

Reaktif	***Nanoplate* 26k (24 kuyucuklu) Hacim/Reaksiyon**	**Final Konsantrasyon**
4x *OneStep Advanced Probe Master Mix*	10 µL	1x
100x *OneStep Advanced RT Mix* (Ters Transkripsiyon)	0.4 µL	1x
20x *primer–probe mix* 1	2 µL	0.4 µM *forward primer* 0.4 µM *reverse primer* 0.2 µM *probe*
Enhancer GC	5 µL	–
RNase içermeyen su	Değişken	–
Template RNA	Değişken	–
Toplam reaksiyon hacmi	**40 µL**	

Tablo 4. Dijital PCR sisteminin çalışma basamakları

Basamak	**Süre**	**Sıcaklık**
Ters transkripsiyon	40 dakika	50°C
RT enzim inaktivasyonu	2 dakika	95°C
2 adımlı döngü (40 döngü)		
Denatürasyon	5 saniye	95°C
Kombine bağlanma/uzama	30 saniye	60°C

Dijital PCR Validasyonu

Dijital PCR sisteminin influenza A, influenza B ve RSV için saptama alt sınırı (limit of detection, LoD), kantitasyon alt sınırı (limit of quantitation, LoQ), doğrusallık, çalışma içi ve çalışmalar arası varyasyonu hesaplanarak validasyon çalışması yapıldı. Bu analizlerde hasta örneklerinden havuzlanarak hazırlanan ve dPCR ile kantite edilen materyaller kullanıldı. Örneklerden seri dilüsyon ile çalışma setleri hazırlandı (Tablo 5, 6, 7).

Tablo 5. RSV için validasyon örneklerinin hazırlanması

Seyreltme Faktörü	Tahmini Konsantrasyon (kopya/mL)	Tahmini Konsantrasyon (log10)
1/2	25700800	7,41
1/4	12850400	7,11
1/40	1285040	6,11
1/400	128504	5,11
1/4000	12850	4,11
1/40000	1285	3,11
1/400000	128,5	2,11

Tablo 6. Influenza B için validasyon örneklerinin hazırlanması

Seyreltme Faktörü	Tahmini Konsantrasyon (kopya/mL)	Tahmini Konsantrasyon (log10)
1/10	32120	4,507
1/100	3212	3,507
1/200	1606	3,206
1/1000	321,2	2,507
1/10000	32,12	1,507

Tablo 7. Influenza A için validasyon örneklerinin hazırlanması

Seyreltme Faktörü	Tahmini Konsantrasyon (kopya/mL)	Tahmini Konsantrasyon (log10)
1/10	416280	5,62
1/100	41628	4,62
1/1000	4162,8	3,62
1/10000	416,2	2,62
1/20000	208,4	2,32

Verilerin Analizi

Dijital PCR (dPCR) için ticari influenza A/B ve RSV primer-probe setleri (Qiagen) kullanıldı. Öncelikle qRT-PCR ile influenza A/B ve RSV pozitif olduğu belirlenen hasta örnekleri ile dPCR sistemi denendi ve yöntemin uygulanabilir olduğu saptandı.

Elüsyondaki konsantrasyon hesabı için kullanılan formül:

Dijital PCR'ın toplam çalışma hacmi 40 µl'dir. "a" dPCR total hacimdeki nükleik asit miktarını verir.

dPCR sonucu = X; giriş hacmi (dPCR testine giren ekstrakt, µl) = V; nükleik asit ekstraksiyon işlemindeki elüsyonda bulunan virus konsantrasyonu =A

$$a = \left(\frac{X}{V}\right) * 40 \quad (1)$$

$$A\ (kopya\ /\ \mu l) = \frac{40 * a}{Elüsyon\ hacmi} \quad (2)$$

Ana örnekteki konsantrasyon hesabı için kullanılan formül:

$$B = \frac{A * Elüsyon\ hacmi}{Ekstraksiyona\ giren\ örnek\ hacmi\ (ml\ olarak)} \quad (3)$$

"B" ekstraksiyona giren ana örnekteki virüs konsantrasyonunu kopya/mL cinsinden verir.

Bir örnek olarak; *template* hacmi 4 µl olan ve 160,6 kopya/µl dPCR sonucu için, ana örnekteki virüs konsantrasyonu → 1070,67 kopya/µl'dir. 0,2 mL ekstraksiyona giren ana örnekteki konsantrasyon ise → 321200 kopya/mL'dir.

Aynı zamanda, göreceli belirsizlik (U_{rel}, CI %95) ve partisyon başına düşen kopya sayıları (λ) da literatür özetinde belirtilen formüllerle (denklem 1 ve denklem 2) hesaplandı.

İstatistiksel analizler SPSS ve Excel Analysis ToolPak kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı belirlendikten sonra regresyon istatistiği uygulandı.

Dijital PCR ile qRT-PCR Verilerinin Karşılaştırılması

Belirli konsantrasyonlar için dPCR ile qRT-PCR testleri arasında karşılaştırma yapıldı. İlk yapılan çalışma, dPCR sonucu ile aynı örneklerin qRT-PCR ile çalışılması sonucu elde edilen Ct değerlerinin karşılaştırılmasıdır. Dijital PCR sonucunda

konsantrasyonları hesaplanan örnekler eş zamanlı olarak "Diagnovital Influenza A/B SARS Cov-2 RSV Multipleks Real-Time PCR Kit" ile Rotor-Gene (Qiagen, Almanya) sisteminde çalışıldı ve bulunan Ct'ler kaydedildi. Tekrarlanabilirlik karşılaştırması için benzer konsantrasyondaki örneklerin seçilmesine özen gösterildi. Aynı çalışmada (çalışma içi) ve farklı günlerde (çalışmalar arası) üç tekrarlı çalışılan örneklerin %CV değerleri, standart sapmanın ortalama değere bölünmesi ile hesaplandı. qRT-PCR testinin Ct değerlerinin log10 kopya/mL karşılığı, şekil 9'da belirtilen dPCR sonuçları ile qRT-PCR Ct sonuçları arasındaki ilişkiye gösteren formül kullanılarak belirlendi ve tekrarlanabilirlik analizinde kullanıldı.

3.6.1. Diagnovital qRT-PCR Test Validasyonu

Nükleik Asit Ekstraksiyonu ve Diagnovital qRT-PCR Testi

Nükleik asit ekstraksiyonu, üreticinin önerileri doğrultusunda Xi'an Tianlong Generotex96 izolasyon cihazı ve Ianlong Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Xi'an Tianlong Science&Technology Co, Çin) kullanılarak yapıldı. Dijital PCR çalışmaları için kullanılan aynı cihaz, aynı kit ve aynı prosedür izlendi. Giriş hacmi 200 µl ve elüsyon hacmi 60 µl idi. Amplifikasyon, 5 µl ekstrakte edilmiş örnek RNA veya pozitif/negatif kontrol ve 15 µl Diagnovital assay (RTA Laboratuvarları, Türkiye) ana karışımı içeren 20 µl reaksiyon karışımında gerçekleştirildi. Testin primer-prob dizileri tablo 8'de gösterilmiştir. Gerçek zamanlı RT-PCR, Rotor-Gene cihazında (Qiagen, Almanya) gerçekleştirildi. Döngü koşulları, 45 ^{0}C'de 10 dakikalık ters transkripsiyon adımı ve 95 ^{0}C'de 2 dakikalık ilk denatürasyon adımını, ardından 95 ^{0}C'de 10 saniyelik ve 55 ^{0}C'de 30 saniyelik 45 döngüyü içeriyordu.

Tüm çalışma boyunca PCR'dan elde edilen Ct sonuçları için şablon bir kayıt formu hazırlandı ve elde edilen tüm Ct sonuçları (Influenza A/B, RSV, Sars-CoV-2, internal kontrol (IC), pozitif ve negatif kontrol sonuçları) bu forma eklenerek arşivlendi. Bu şablon form tablo 8' de verilmiştir. PCR sonuçlarının kaydedildiği şablon rapor tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 8. Diagnovital kitinde kullanılan primer ve prob dizileri

Virus *	Primerler ve problar
InfA-F1	CAA GAC CAA TCY TGT CAC CTC TGA C
InfA-F2	CAA GAC CAA TYC TGT CAC CTY TGA C
InfA-R1	GCA TTY TGG ACA AAV CGT CTA CG
InfA-R2	GCA TTT TGG ATA AAG CGT CTA CG
InfB-F	TCC TCA AYT CAC TCT TCG AGC G
InfB-R	CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG
SC2-F	CTG CAG ATT TGG ATG ATT TCT CC
SC2-R	CCT TGT GTG GTC TGC ATG AGT TTA G
RP-F	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G
RP-R	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT
RSV-F2	GCA AAT ATG GAA ACA TAC GTG AAC A
RSV-R2	GCA CCC ATA TTG TWA GTG ATG CA
InfA-P	5'-/FAM/TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG/BHQ1/-3'
InfB-P	5'-/FAM/CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG/BHQ1/-3'
SC2-P	5'-/TexRd/ATT GCA ACA ATC CAT GAG CAG TGC TGA CTC/BHQ2/-3'
RP-P	5'-/HEX/TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG/BHQ2/-3'
RSV-P2	Cy5-CTT CAC GAA GGC TCC ACA TAC ACA GCW G-BHQ2

* InfA: influenza A virus, InfB: influenza B virus, SC2: SARS-CoV-2, RP: human ribonuclease P (internal control), F: forward primer, R: reverse primer, P: probe

Tablo 9. PCR'dan elde edilen Ct sonuçları için şablon kayıt formu

DIAGNOVITAL INFLUENZA A/B SARS-CoV-2 RSV Multipleks Real Time PCR Kit					
Kit LOT:			**Tarih:**		
ÖRNEK NO	**FAM (GREEN) (İNF A/B)**	**ROX (ORANGE) SARS CoV-2**	**CY5 (RED) RSV**	**HEX (YELOW) İK**	**SONUÇ**
1.					
2.					

qRT-PCR Validasyon Basamakları

Analitik Duyarlılık (LoD)

Her virüs (InfA, InfB, RSV, SC2) için analitik duyarlılık (tespit sınırı), her patojen için hazırlanan seyreltme serileri (10^5-10^1 kopya/mL) kullanılarak Probit regresyon analizi (115) ile hesaplandı (Tablo 10). Analitik duyarlılık çalışmasında kullanılan InfA, InfB ve RSV örnekleri ayrı ayrı seyreltildi ve her seyreltme, dijital PCR (dPCR) kullanılarak kopya/mL olarak belirlendi. Tespit sınırı (LoD), dPCR sonuçlarına göre belirlendi. Seri seyreltme sırasında artan seyreltme oranlarıyla viral yükler beklenenden daha fazla azalabileceğinden, özellikle düşük viral yüke sahip olan seyreltilmiş örneklerin viral yükü dPCR kullanılarak yeniden değerlendirildi. Probit analizi için %95 güven aralığıyla SPSS (IBM, 2022) kullanıldı. Daha geniş aralıklı bir seyreltme serisi (10^7-10^1 kopya/mL), Ct'ye karşı grafikteki R^2 değerini belirlemek ve PCR verimliliğini hesaplamak için de kullanıldı. Standart eğrinin denklemi ve R^2 değeri Excel v2018 (Microsoft, Redmond, WA) kullanılarak hesaplandı. Amplifikasyon yüzdesi verimliliği, tanımlanmış bir formül kullanılarak hesaplandı (92).

Tablo 10. Probit regresyon analizinde kullanılan konsantrasyonlar

	SC2 ALFA		***SC2 OMICRON***		***INFA***		***INF B***		***RSV***	
TEKRAR SAYISI	Kopya/mL	Log_{10} kopya/mL	Kopya/mL	Log_{10} kopya/mL	Kopya/mL	Log_{10} kopya/mL	Kopya/mL	Log_{10} kopya/mL	Kopya/mL	Log_{10} kopya/mL
10	2000	3,30	37000	4,56	5566	3,74	121060	5,08	20700	4,32
10	1000	3,00	3700	3,56	556	2,74	12106	4,08	2070	3,32
10	200	2,30	370	2,56	323,33	2,5	1057	3,02	1276,66	3,10
10	100	2,00	185	2,26	80	1,9	350	2,54	160	2,2
10	50	1,70	46	1,66	5	0,7	63	1,8	80	1,9

Analitik Özgüllük

Analitik özgüllük çalışması için 120 adet tüm solunum yolu virusları için negatif olan hasta örneği çalışıldı. Ayrıca, Influenza A, influenza B, RSV ve SARS-CoV-2 için negatif olan toplam 33 adet örnek de analitik özgüllük belirlemek için çalışıldı. Bu örnekler, coronavirus HKU-1(n=7), coronavirus OC43(n=9), coronavirus 229E(n=6), bocavirus (n=3), rhinovirus (n=5), parechovirus (n=3) idi. Örnekler

seçilirken, valide edilen kitin hedeflediği viruslara genetik yakınlık göz önüne alındı. Analitik özgüllük % olarak ifade edildi.

Kesinlik

InfA, InfB, RSV ve SC2 için kesinlik analizi (çalışma içi ve çalışmalar arası), farklı konsantrasyonlardaki örneklerin üç tekrarlı çalışılması ile gerçekleştirildi (aynı çalışmada çalışma içi tekrarlanabilirlik için 3 kez ve çalışmalar arası tekrarlanabilirlik için 3 farklı günde bir kez test edildi). Kesinlik analizi Ct üzerinden yapıldı. Kesinlik çalışması için seçilen örnek konsantrasyonları, tespit sınırına (analitik duyarlılık, *LoD*) (75,76) yakın olacak şekilde ayarlandı. Sonuçlar, yüzdelik varyasyon katsayısı (%CV) olarak ifade edildi.

Doğruluk

RSV (n=39), InfA veya InfB (n=71), SARS-CoV-2 (n=64) için PCR pozitif klinik örnekler doğruluk çalışması için kullanıldı. Doğruluk analizi, toplam gerçek pozitif ve negatiflerin toplamının, tüm örneklerin toplamına bölünmesi ile elde edildi. Ayrıca SPSS kullanılarak kappa analizi gerçekleştirildi. Kappa analizi, kappa değeri (κ) ile ifade edildi. Ek olarak, QCMD 2022 solunum dış kalite kontrol paneli (RESPI22C1, RESPII22C1, RESPIII22C1) ile, panel içeriği bilinmeden tek kör çalışması yapıldı. RESPI22C1, RESPII22C1, RESPIII22C1 panelleri beşer örnek içermektedir. Her örnek, yeni kit ile iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

Multipleks Etkinlik

Kitin multipleks etkinliğini ölçmek amacıyla Influenza A, Influenza B, RSV ve SARS-CoV-2 için düşük ve yüksek PCR Ct değerlerine sahip örnekler karıştırılarak farklı kombinasyonlarda test edildi.

Kit Karşılaştırma Çalışması

Valide edilen Diagnovital test kiti, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Moleküler Tanı laboratuvarında kullanımda olan testlerle karşılaştırıldı. İnfluenza A, influenza B ve RSV için “Bio-Speedy Respiratory Tract

4T RT-qPCR Kiti" (Bioeksen, Türkiye) kullanılırken, SARS-CoV-2 için "DS Coronex Covid-19 Multipleks Real Time-qPCR Test Kiti" (Ds Bio and Nano Technologies Laboratuvarları, Türkiye) kullanıldı. Tüm analizler üreticilerin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

İki farklı kitten elde edilen aynı örneğin Ct sonuçları karşılaştırma için kullanıldı. Sonuçlar arasındaki farklar SPSS (versiyon 21.0) yazılımında tek örnek t testi ile analiz edildi ve p değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışma boyunca kullanılan sarf malzeme ve cihazların listesi ve kullanım amaçları tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Malzeme adı	**Marka/Lot Numarası**	**Kullanım amacı**
Ekstraksiyon Cihazı	Xi'an Tianlong Generotex96	Tüm örneklerin nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan cihaz
Ekstraksiyon kiti	IanLong Nucleic Acid Extraction Kit/21092620T014H	Tüm örneklerin nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan kit
Amplifikasyon kiti	Diagnovital İnfluenza A/B SARS-COV-2- RSV Multipleks Real Time PCR Kit/SA1257821	Validasyonu gerçekleştirilen ticari amplifikasyon kiti
Amplifikasyon kiti	CoronexCOVID-19 QPCR Test Kit (DS Bio ve Nano Teknoloji)/DS-CS19-M1000	Kit karşılaştırma çalışmasında kullanılan COVID-19 Tanı amplifikasyon kiti
Amplifikasyon kiti	Bio-Speedy Respiratory Tract 4T RT-qPCR Kiti" (Bioeksen, Türkiye)/09078100	Kit karşılaştırma çalışmasında kullanılan InfA, InfB, RSV Tanı amplifikasyon kiti
Soğutucu (-20 ^{0}C ve +4 ^{0}C)	Bosh KGN56A00NE	Tüm örneklerin, kitlerin saklanması
-80 ^{0}C Soğutucu	Thermo Scientific Forma 900 Serisi	Hasta örnekleri, ekstrakte edilmiş nükleik asitlerin uzun süreli (>1 ay) saklanması
Biyogüvenlik Kabini	NUVE MN90	Ekstraksiyon ve amplifikasyon hazırlıkları
Vorteks	Isolab 622.01.001	Ekstraksiyon öncesi örneklerin homojenizasyonu
PCR cihazı	Rotor-Gene Q 0517122 (Software 2.3.5.1)	Amplifikasyon çalışmaları
PCR Tüpü	Roche Strip PCR Tubes and Caps/ 11667009001	Mastermix ve nükleik asit karıştırılarak PCR işlemi gerçekleştirilir
NANODROP Cihazı	NanoPhotometer N60 (IMPLEN, Almanya)	Nükleik asit konsantrasyonları (OD 260/280 oranı) ölçümü
Pipet Ucu 10 µl – Nuclease free ve filtreli	ThermoFisher tips AM12635	Ekstraksiyon, amplifikasyon, dijital PCR çalışmalarında sıvı transferi için
Pipet Ucu 100 µl - Nuclease free ve filtreli	ThermoFisher tips AM12648	Ekstraksiyon, amplifikasyon, dijital PCR çalışmalarında sıvı transferi için

Pipet Ucu 1000 µl - Nuclease free ve filtreli	ThermoFisher tips AM12655	Ekstraksiyon, amplifikasyon, dijital PCR çalışmalarında sıvı transferi için
Eppendorf tüp	Nuclease free 0,2-0,5 mL steril tüp /AB-0337-AB-0350	Örnek dilüsyonlarında, numune saklanmasında vs
Mikropipet 100-1000	ThermoScientific	Ekstraksiyon, amplifikasyon, dijital PCR çalışmalarında sıvı transferi için
Mikropipet 10-100	Eppendorf	Ekstraksiyon, amplifikasyon, dijital PCR çalışmalarında sıvı transferi için
Mikropipet 0.5-10	Eppendorf	Ekstraksiyon, amplifikasyon, dijital PCR çalışmalarında sıvı transferi için
Dijital PCR Cihazı	QIAcuity, Qiagen, Almanya/ 911001	Dijital PCR analizinin gerçekleştirildiği cihaz
Dijital PCR Master mix	4x OneStep Advanced Probe Master Mix/250131	Dijital PCR çalışmasında master mix olarak kullanıldı
Ters transkripsiyon mix	100x OneStep Advanced RT Mix	Dijital PCR çalışmasında RNA'dan DNA elde edilmesi için kullanıldı
Dijital PCR primer/prob seti	Influenza A (11320) için DMA00373 katalog numaralı (hedef gen: segment 7 matris protein geni), influenza B (11520) için DMA00374 katalog numaralı (hedef gen: segment 8 nükleer eksport proteini (NEP) geni), RSV (12814) için DMA00379 katalog numaralı (hedef gen: matriks protein geni) primer/prob seti (Qiagen Almanya)	Dijital PCR çalışmasında primer/prob olarak kullanıldı
QCMD EQA paneli	RESPI22C1, RESPII22C1, RESPIII22C1	Dış kalite kontrol materyali, pozitif kontrol, doğruluk çalışmalarında

3.7.Verilerin Değerlendirilmesi

Dijital PCR sonuçarının istatistiksel analizleri SPSS (IBM,2022) ve Excel Analysis ToolPak kullanılarak gerçekleştirildi. Probit analizi için %95 güven aralığıyla SPSS (IBM, 2022) kullanıldı. PCR verimliliğini hesaplamak için Excel v2018 (Microsoft, Redmond, WA) kullanıldı.

Kit karşılaştırma çalışmasından elde edilen aynı örneğin Ct sonuçları arasındaki farklar SPSS (versiyon 21.0) yazılımında tek örnek t testi ile analiz edildi ve p değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.8.Araştırmanın Sınırlılıkları

Influenza A/B ve RSV için kantitatif kontrollerin bulunamaması çalışmada karşılaşılan en büyük zorluk olmuştur. Bu sorunun çözümü için çalışma devam ederken 1002-B TÜBİTAK projesi yazılmış ve bu projeden elde edilen bütçe ile Influanza A, Influenza B ve RSV pozitif örneklerden ditijal PCR kullanılarak kantitatif materyal elde edilmiştir. Kit karşılaştırma çalışmasında Influenza A/B ve RSV için eski sonuçlarla karşılaştırma yapılması farkların saçılmasına sebep olmuştur. Ayrıca arşiv sonucu olan çoğu pozitif Inf A/B ve RSV hasta örneğinin -80 0C stoklarda bulunamaması büyük zorluk olmuştur. Bu viruslar mevsimsel olduğu için, pozitif örnekler kış sezonu boyunca toplanmış ve doğruluk çalışması bu şekilde gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca stok örneklerinin tekrarlı dondur çözdür yapılma zorunluluğu virüs kaybına sebep olmuştur.

3.9.Etik Kurul Onayı

İzmir Ekonomi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırmaları Etik Kurulu 07.03.2022 tarih ve B.30.2.İEÜSB.0.05.05-20-151 numaralı **‘‘RSV, Influenza ve SARS-CoV-2 için Multipleks RT-PCR Testi Validasyonu’’** başlıklı doktora tezi araştırma projesinin etik kurul izni alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Dijital PCR Bulguları

Toplam 12 farklı QCMD örneği ve 3 farklı virus için hazırlanan 3 farklı hasta havuz örneği dPCR ile çalışılmış ve çalışma sonuçları tablo 11'da verilmiştir. Tablo 12'de, örneklerin nanodrop ile belirlenen nükleik asit miktarları, qRT-PCR sonuçları (Ct olarak), dPCR'daki partisyon başına düşen ortalama nükleik asit sayısı (λ) ve CI (%95) değerleri gösterilmektedir. Dilüsyon yapılan örneklerde dilüe edilen materyaller nanodrop il eve qRT-PCR ile değerlendirilmemiştir.

Tablo 12. Dijital PCR ile kantite edilen örnekler ve elde edilen konsantrasyon değerleri

Örnek Template hacmi: 4 µl	Nanodrop NA Miktarı (ng/µL)	qRT-PCR Ct değeri	dPCR sonucu (kopya/µL)	λ (-ln((w/n)) *	CI (% 95) (U_{rel})	Elüsyondaki konsantrasyon (kopya/µL)	Ana Stoktaki Konsantrasyon	
							Kopya/mL	Log10 kopya/mL
7. QCMD InfA H1N1	4	28,28	20,58	0,0170	% 9,5	137,2	41160	4,614475
7. QCMD InfA H1N1 1/2 Dilüsyon	N/A	N/A	10,37	0,0085	% 13,3	69,13333	20740	4,316809
11. QCMD InfA H1N1	5,1	30,16	9,207	0,0075	% 14,1	61,38	18414	4,265148
11. QCMD InfA H1N1 1/2 Dilüsyon	N/A	N/A	4,211	0,0034	% 20,9	28,07333	8422	3,925415
3. Hasta InfA havuzu	7,15	22,7	2081,4	1,7096	% 1,5	13876	4162800	6,619386
3. Hasta InfA havuzu 1/2 dilüsyon	N/A	N/A	1005,1	0,8255	% 1,7	6700,667	2010200	6,303239
3. Hasta InfA havuzu 1/4 dilüsyon	N/A	N/A	464	0,3811	% 2,2	3093,333	928000	5,967548
1. QCMD InfB Victoria	1,5	28,15	25,87	0,0212	% 8,5	172,4667	51740	4,713826
5. QCMD InfB Victoria	3,45	32,62	2,199	0,0018	%28,9	14,66	4398	3,643255
6. QCMD InfB Yamagata	2,40	32,01	3,923	0,0032	%21,6	26,15333	7846	3,894648
9. QCMD InfB Victoria	4,75	32,6	2,632	0,0021	%26,4	17,54667	5264	3,721316

10. QCMD InfB Yamagata	3,80	31,34	4,883	0,0040	%19,4	32,55333	9766	3,989717
5. Hasta havuzu InfB	9,15	25,73	160,6	0,1318	%3,5	1070,667	321200	5,506776
2. QCMD InfB Yamagata	1,85	33,29	3,206	0,0026	%23,9	21,37333	6412	3,806994
3. QCMD RSVA	1,35	31,25	5,08	0,0041	%19,0	33,86667	10160	4,006894
4. QCMD RSVB	2,75	29,24	28,39	0,0233	%8,1	189,2667	56780	4,754195
8. QCMD RSVB	4,25	29,05	35,92	0,0295	%7,2	239,4667	71840	4,856366
12. QCMD RSVB	3,60	29,36	25,83	0,0212	%8,5	172,2	51660	4,713154
1. Hasta havuzu RSV	23,9	18,42	0	0	-	0	0	0
1. Hasta havuzu RSV 1/2	N/A	N/A	0	0	-	0	0	0
1. Hasta havuzu RSV 1/4	N/A	N/A	6425,2	5,2777	%3,3	42834,67	12850400	7,108917

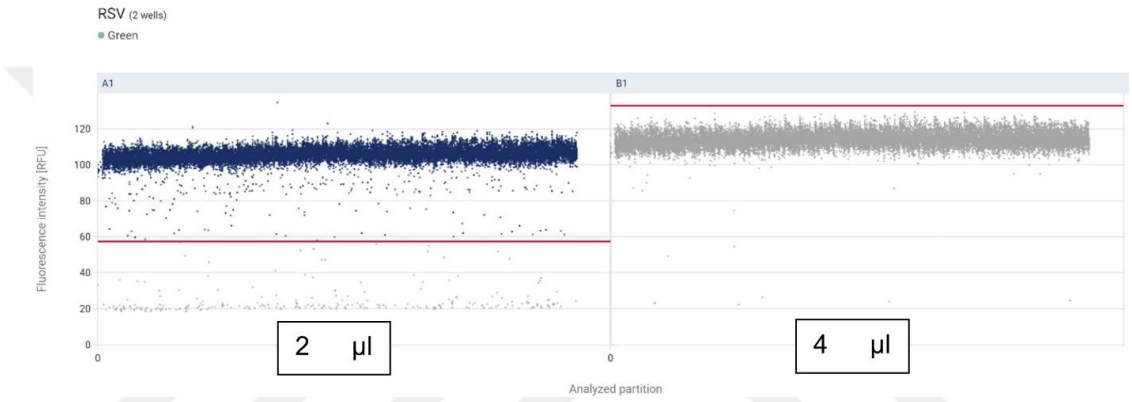
*W= negatif partisyon sayısı, n= geçerli toplam partisyon sayısı, N/A= “not available” (çalışılmadı)

Elde edilen sonuçlardan görüleceği gibi (Tablo 12), dPCR testi, belli bir konsantrasyonun üzerindeki örneklerde sonuç verememektedir. Çalışmada RSV 1. hasta havuzu örneği çalışıldığında ancak 1/4 dilüsyonda yani 12.850.400 kopya/mL’de sonuç alınırken, bu havuzun 1/2 konsantrasyonunda (varsayılan viral yük: 25.700.800 kopya/mL) ve dilüe edilmemiş (varsayılan viral yük: 51.401.600 kopya/mL) konsantrasyonunda sonuç alınamamıştır. Partisyon başına düşen kopya sayısı 5’in üzerine çıkınca, Poisson dağılımına göre cihaz hesap yapamamakta, bu sebeple de tüm pozitif partisyonları negatif olarak göstermekte, sonucu “0” olarak vermektedir.

Dağılım grafiğinde (Şekil 1), aynı örneğin dPCR reaksiyonuna farklı *template* hacimlerindeki çalışma sonucu görülmektedir. İlk kuyuya 2 µl, ikinci kuyuya 4 µl örnek hacmi eklenmiştir. Bu grafikte mavi noktalar pozitif partisyonları, gri noktalar ise negatif partisyonları göstermektedir. 4 µl’lik çalışmada pozitif sinyal alınamamıştır. Dijital PCR, çok düşük ve çok yüksek konsantrasyonlarda sonuç vermemektedir; örnek konsantrasyonunun belirli bir aralıkta bulunması gerekmektedir. Çip bazlı dPCR sistemlerinde, nükleik asitin dağılacağı belli bir

partisyon sayısı (bu çalışmada 26 bin partisyon kullanılmıştır) vardır ve tüm partisyonlarda 5 kopyadan fazla nükleik asit bulunduğunda, Poisson dağılımına göre hesap yapılamamaktadır. Çalışmada influenza A için 20 kopya/mL, RSV için 300 kopya/mL'nin altındaki konsantrasyonlarda 4 mikrolitre girildiğinde sonuç alınamamıştır. Bu sebeple düşük konsantrasyonlu örneklerde örnek hacmi maksimum değer (20 µl) ile çalışılmıştır. Şekil 1'de verilen dağılım grafiğinde mavi noktalar pozitif partisyonları, gri noktalar negatif partisyonları göstermektedir.

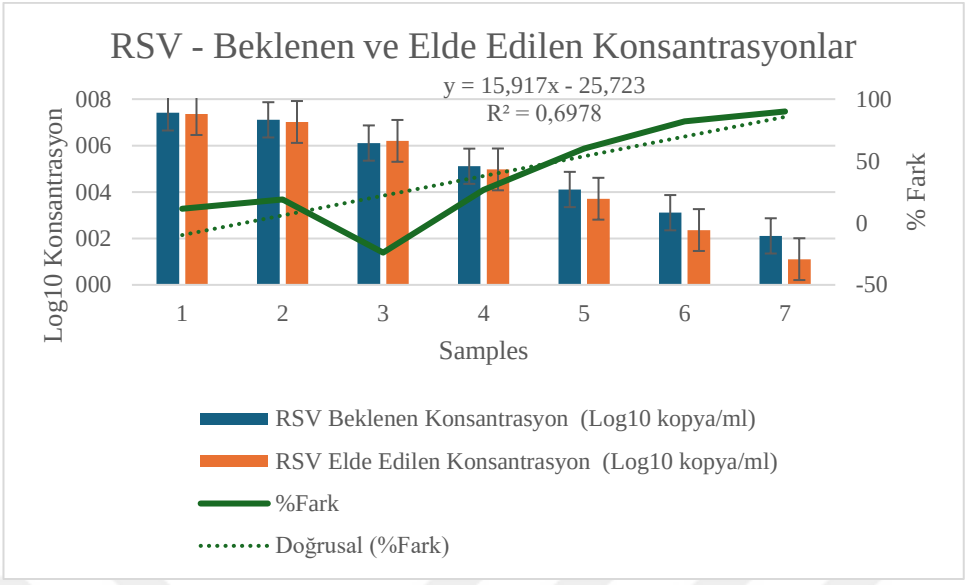
4.1.1. Dijital PCR Validasyon Bulguları



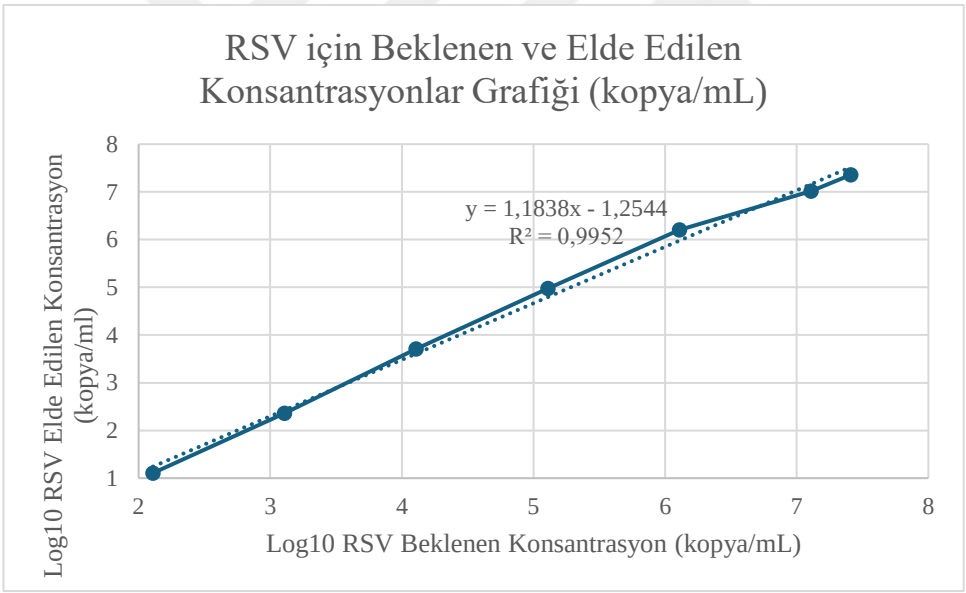
Şekil 1. RSV çalışmasında 2 µl ve 4 µl template RNA hacmi için RSV dağılım grafiği

Dijital PCR testinin validasyonu için influenza A, influenza B, RSV RNA içeren üç farklı örnek ile hazırlanan dilüsyonlar çalışılmış; saptama alt sınırı (LoD), kantitasyon alt sınırı (LoQ), doğrusallık, çalışma içi ve çalışmalar arası varyasyon değerleri belirlenmiştir.

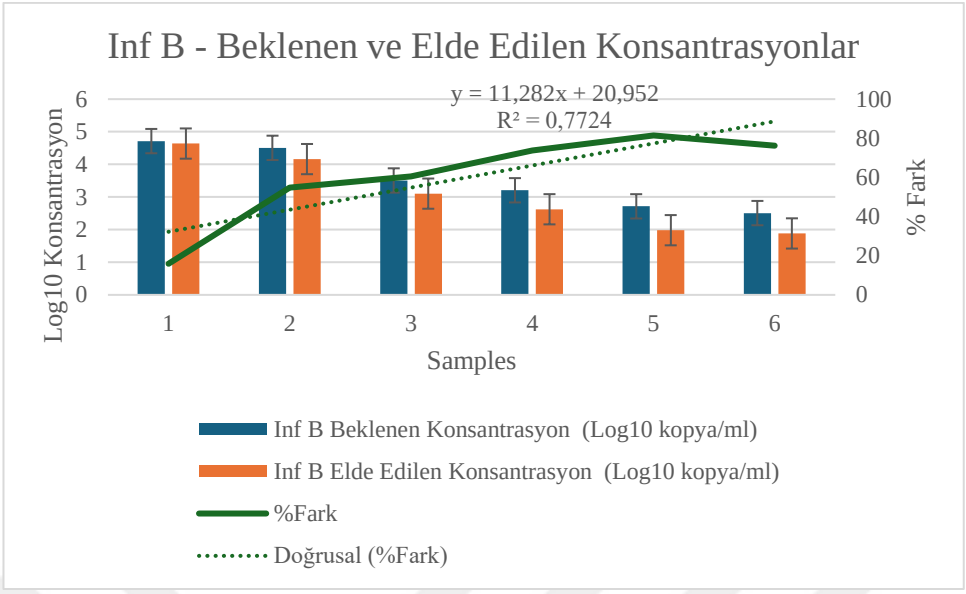
İnfluenza A ve B için 5'er dilüsyonluk, RSV içinse 7 dilüsyonluk seri hazırlanmış, her dilüsyon dPCR ile çalışılmış, sonuç alınmayan dilüsyonlar analize dahil edilememiştir. Dilüsyon setlerinde hesaplanan tahmini (beklenen) konsantrasyonlar ile dPCR sonucu elde edilen konsantrasyonlar arası ilişkiyi gösteren lineerite grafikleri grafikleri Grafik 1-6'da verilmiştir.



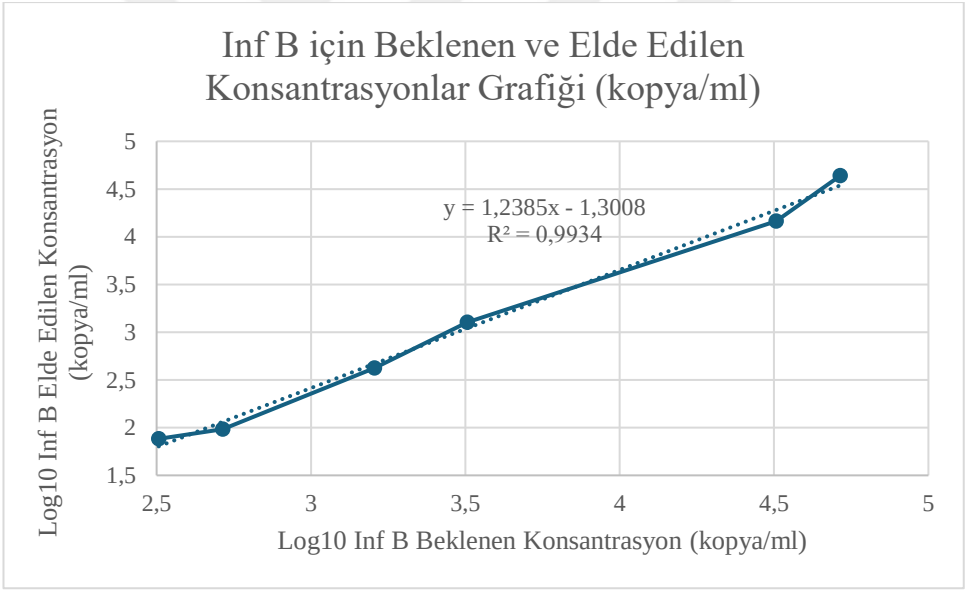
Grafik 1. RSV için beklenen ve dPCR ile elde edilen değerler arasındaki % fark grafiği



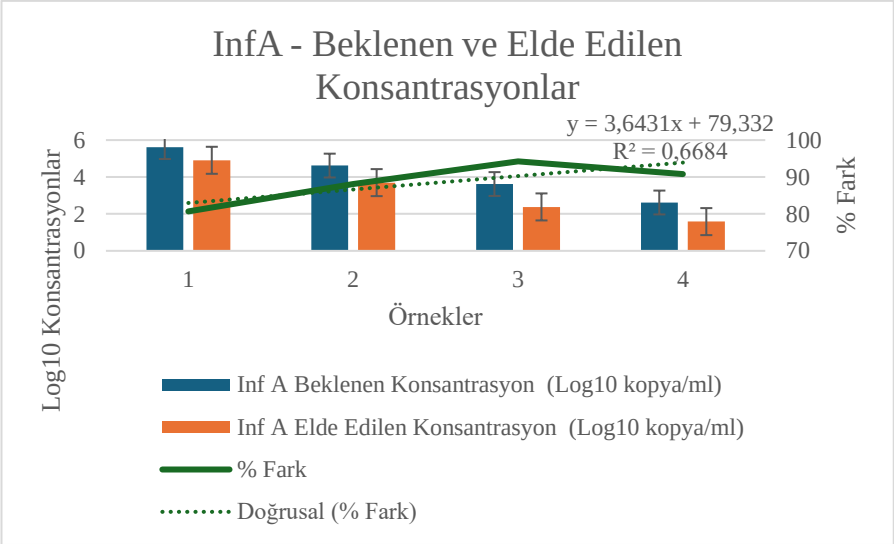
Grafik 2. RSV için beklenen ve dPCR ile elde edilen sonuçlar arasındaki lineer regresyon grafiği



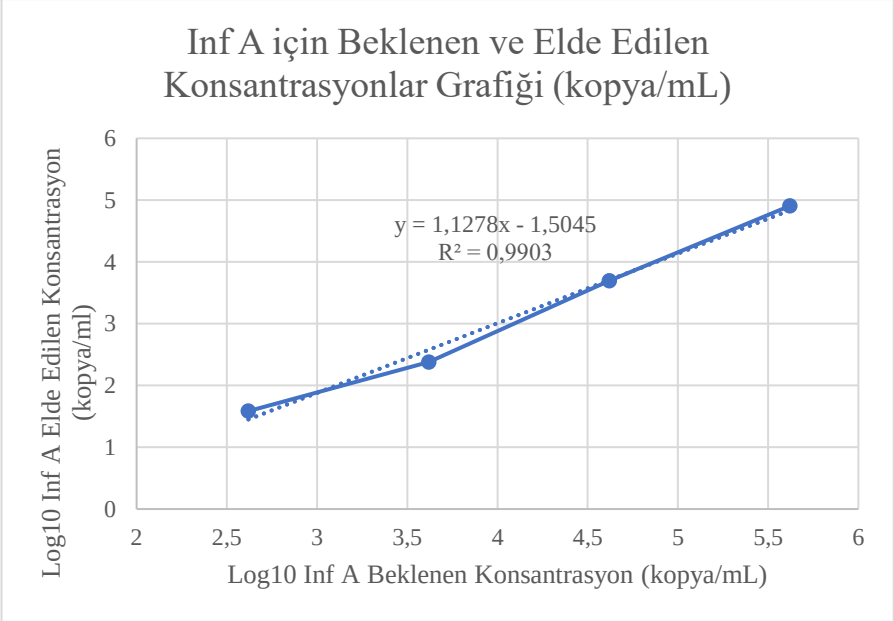
Grafik 3. Influenza B için beklenen ve dPCR ile elde edilen değerler arasındaki % fark grafiği



Grafik 4. Influenza B için beklenen ve dPCR ile elde edilen sonuçlar arasındaki lineer regresyon grafiği



Grafik 5. Influenza A için beklenen ve dPCR ile elde edilen değerler arasındaki % fark grafiği



Grafik 6. Influenza A için beklenen ve dPCR ile elde edilen sonuçlar arasındaki lineer regresyon grafiği

Influenza A, B ve RSV için dPCR LoD ve LoQ değerlerinin hesaplanması, lineer regresyon grafiklerinin kesme noktası standart hatası, eğimi ve kesme noktasının standart sapması hesaplanarak elde edilmiştir (Tablo 13) (116).

Tablo 13. Influenza A, influenza B ve RSV için dPCR LoD ve LoQ değerleri

	RSV dPCR	**Inf A dPCR**	**Inf B dPCR**
Kesme Noktasının Standart Hatası	0,1719	0,3369	0,1827
Lineer Regresyon Grafiğinin Eğimi	1,1712	1,1278	1,2385
Kesme Noktasının Standart Sapması (SDI)	0,4211	0,6739	0,4477
LOD (3,3*(SDI/$\sqrt{N}$)) (log10 kopya/mL)	1,1867	1,97194971	1,1929
LOQ (10*(SDI/$\sqrt{N}$)) (log10 kopya/mL)	3,5961	5,9756	3,6149

$p<0,05$

dPCR sisteminin influenza A, B ve RSV'nin çalışmalar arası %CV sonuçları Tablo 14'de gösterilmektedir. Çalışmalar arası %CV 0,59 - 5,41 arasındadır.

Tablo 14. İnfluenza A, influenza B ve RSV örnekleri için dPCR çalışmalar arası %CV

Örnek (log10 kopya/mL)	**1. Çalışma (log10 kopya/mL)**	**2. Çalışma (log10 kopya/mL)**	**3. Çalışma (log10 kopya/mL)**	**Ortalama**	**Standart Sapma**	**%CV**
RSV (4,8)	**4,85**	4,82	4,78	4,81	0,03	0,73
RSV (7,7)	**7,71**	7,65	7,62	7,66	0,04	0,59
INFA (4,6)	**4,61**	4,53	4,49	4,54	0,06	1,34
INFA (2,8)	**2,82**	2,68	2,53	2,67	0,14	5,41
INFB (4,7)	**4,71**	4,67	4,60	4,66	0,05	1,19

dPCR sisteminin influenza A, B ve RSV'nin farklı konsantrasyonlarında çalışma içi %CV sonuçları Tablo 15'de gösterilmektedir. Çalışma içi %CV 0,38 - 5,97 arasındadır.

Tablo 15. Farklı konsantrasyonlarda influenza A, influenza B ve RSV için dPCR çalışma içi %CV

Örnek (log10 kopya/mL)	1. Çalışma (log10 kopya/mL)	2. Çalışma (log10 kopya/mL)	3. Çalışma (log10 kopya/mL)	Ortalama	Standart Sapma	dPCR CI (% 95) kopya/µL	%CV
RSV (6,1)	6,21 (λ=3,360)	6,19 (λ=3,259)	6,17 (λ=3,193)	6,19	0,02	%6,4	0,38
RSV (5,1)	4,95 (λ=0,182)	4,97 (λ=0,189)	5,00 (λ=0,206)	4,97	0,03	%16	0,55
RSV (4,1)	3,72 (λ=0,010)	3,67 (λ=0,009)	3,74 (λ=0,011)	3,71	0,04	%20,2	0,97
RSV (3,1)	2,46 (λ=0,0006)	2,36 (λ=0,0004)	2,24 (λ=0,0003)	2,35	0,11	%62,1	4,74
INFA (5,6)	4,90 (λ=0,164)	4,91 (λ=0,165)	4,91 (λ=0,166)	4,91	0,00	%1,7	0,06
INFA (4,6)	3,66 (λ=0,009)	3,75 (λ=0,011)	3,68 (λ=0,009)	3,69	0,05	%26,5	1,22
INFA (3,6)	2,28 (λ=0,0004)	1,98 (λ=0,0002)	2,28 (λ=0,0004)	2,18	0,17	%86,1	7,97
INFB (4,5)	4,15 (λ=0,0289)	4,17 (λ=0,0300)	4,17 (λ=0,0304)	4,16	0,01	%6,5	0,27
INFB (3,5)	3,09 (λ=0,0025)	3,01 (λ=0,0021)	3,19 (λ=0,0031)	3,10	0,09	%49	2,76
INFB (2,5)	1,76 (λ=0,0001)	1,88 (λ=0,0001)	1,98 (λ=0,0002)	1,87	0,11	%62,1	5,97

λ: partisyon başına düşen kopya sayısı

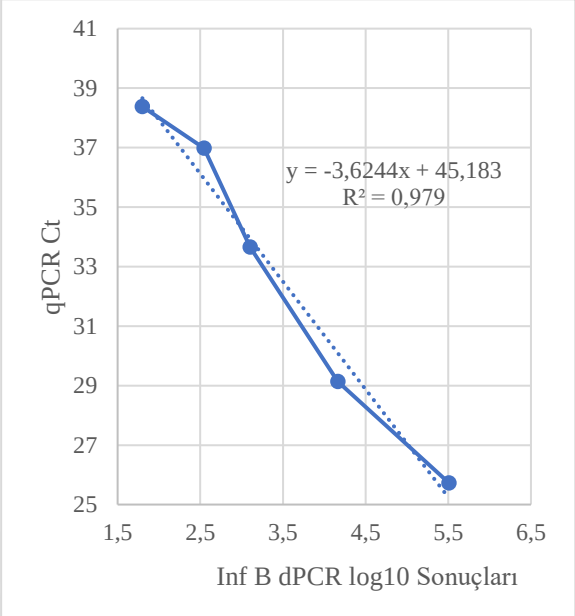
4.1.2. Dijital PCR ile QRT-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

İki yöntemin sonuçlarının karşılaştırılması amacı ile örnekler, eş zamanlı olarak hem dPCR hem de "Diagnovital Influenza A/B SARS Cov-2 RSV Multipleks Real-Time PCR Kit" ile çalışılmış ve bulunan Ct değerleri Tablo 16'da verilmiştir.

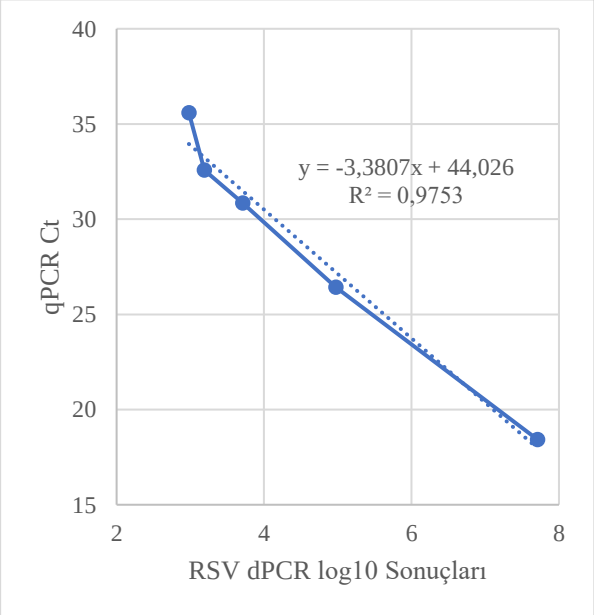
Tablo 16. İnfluenza A, influenza B ve RSV örneklerinin dPCR konsantrasyon sonuçları ile qRT-PCR Ct değerlerinin karşılaştırması

İnf B konsantrasyonu			İnf A konsantrasyonu			RSV konsantrasyonu		
kopya/mL	**Log10 kopya/mL**	**Ct**	**kopya/mL**	**Log10 kopya/mL**	**Ct**	**kopya/mL**	**Log10 kopya/mL**	**Ct**
321200	5,507	25,73	4162800	6,62	22,7	51401600	7,71	18,42
14528	4,162	29,14	80400	4,90	29,1	94053	4,97	26,42
1268	3,103	33,65	4961	3,70	32,42	5137	3,71	30,84
350	2,544	36,98	668	2,82	34,89	1551	3,19	32,57
63	1,780	38,38	388	2,59	35,21	956	2,99	35,59

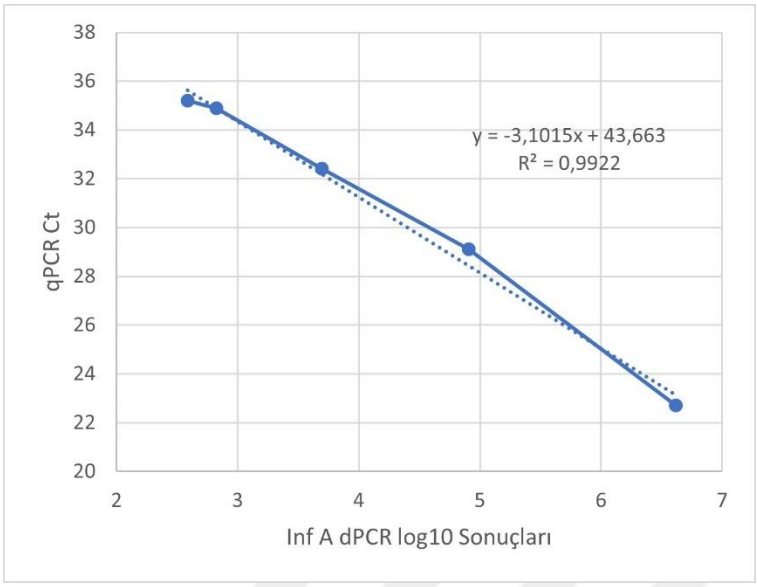
dPCR ile ölçülen konsantrasyonların qRT-PCR Ct sonuçları ile korele olduğu saptanmıştır ($p<0,01$).



Grafik 7. Influenza B dPCR sonuçları ile qRT-PCR Ct değerleri arasındaki doğrusal regresyon grafiği



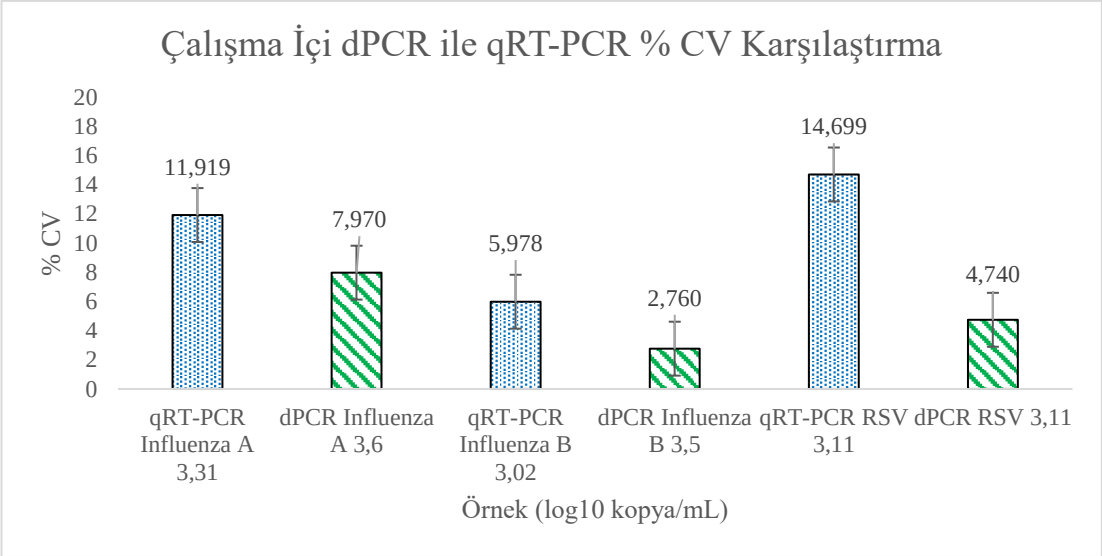
Grafik 8. RSV dPCR sonuçları ile qRT-PCR Ct değerleri arasındaki doğrusal regresyon grafiği



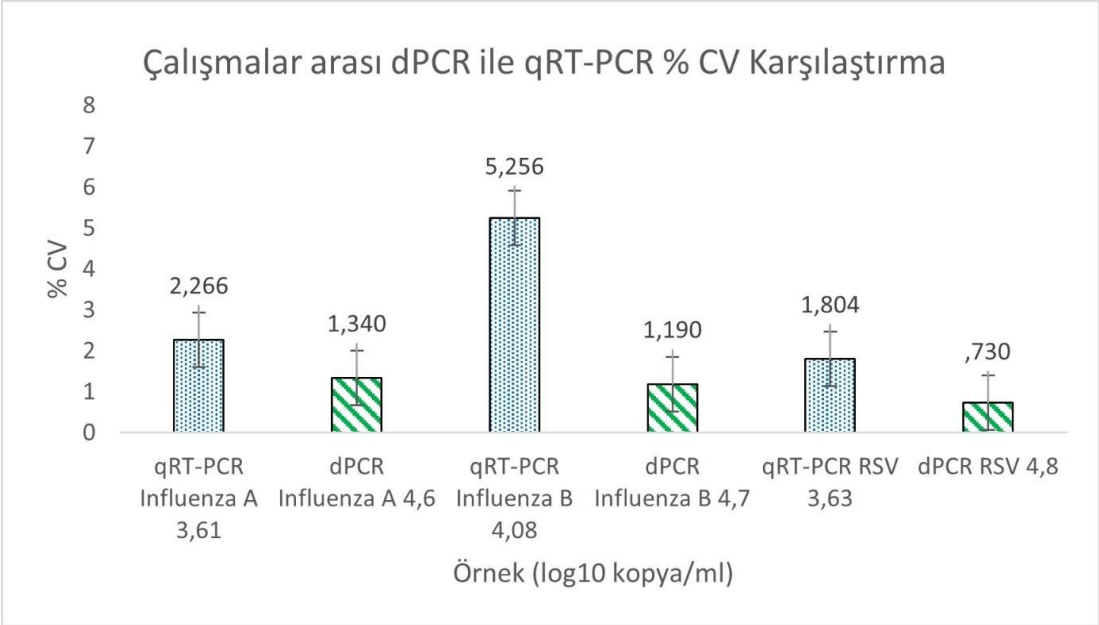
Grafik 9. Influenza A dPCR sonuçları ile qRT-PCR Ct değerleri arasındaki doğrusal regresyon grafiği

dPCR ile elde edilen sonuçlar ile bu örneklerin qRT-PCR Ct sonuçları arasındaki ilişkiyi değerlendiren grafikler Grafik 7-9'da verilmektedir. Bu grafiklerden elde edilen y=ax+b formülü, Ct değerlerinin log10 kopya/mL değerlerine dönüştürülmesi için kullanılmıştır.

dPCR ile qRT-PCR testlerinin çalışma içi ve çalışmalar arası tekrarlanabilirlik sonuçları karşılaştırıldığında, dPCR'ın %CV değerinin daha düşük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p = 0,035) saptanmıştır (Grafik 10,11).



Grafik 10. dPCR ile qRT-PCR tekrarlanabilirlik (çalışma içi) verilerinin karşılaştırması



Grafik 11. dPCR ile qRT-PCR tekrarlanabilirlik (çalışmalar arası) verilerinin karşılaştırması

4.2.qRT-PCR Validasyon Bulguları

4.2.1. Analitik Duyarlılık (LoD)

dPCR çalışması ile elde edilen influenza A, influenza B ve RSV kantitatif standartları kullanılarak qRT-PCR testinin validasyon çalışmaları içinde yer alan LoD ve tekrarlanabilirlik analizleri tamamlandı. Analitik duyarlılığı analiz edilen tüm

virüsler için PROBIT analizi ile LoD belirlenebilmesi için verilerin normal dağılıma uyduğu Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17. SARS-CoV-2, Influenza A, influenza B ve RSV konsantrasyon ve pozitiflik verilerinin normallik test sonuçları

	SC2 Alfa		SC2 Omicron		İnfluenza B		İnfluenza A		RSV	
	Pozitiflik	Konsantrasyon	Pozitiflik	Konsantrasyon	Pozitiflik	Konsantrasyon	Pozitiflik	Konsantrasyon	Pozitiflik	Konsantrasyon
Skewness	-1,331	1,811	-0,782	1,114	-0,9	1,513	-0,796	1,515	-1,128	1,514
Kurtosis	-0,241	1,399	-0,349	0,412	-1,241	0,355	-1,425	0,361	-0,759	0,359

SARS-CoV-2 Alfa ve Omicron varyantları, RSV, influenza A ve influenza B için Diagnovital qRT-PCR kitinin analitik duyarlılık (LoD) sonuçları Probit analizi ile belirlenmiş ve sırası ile 420.7 kopya/mL (95% *confidence interval* (CI):206–31706), 296.7 (%95 CI:169.2-10188.4) kopya/mL, 1459.7 (%95 CI:616.6-18452.7) kopya/mL, 368.6 kopya/mL (%95 CI:200.9-3416.7), 1362.6 kopya/mL (%95 CI:679.3-10708.9) olarak saptanmıştır (Tablo 18-27).

Tablo 18. SARS CoV-2 Alfa LoD Probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları

Konsantrasyon (kopya/mL)	Log 10 kopya/mL	Pozitiflik Oranı
20000	4,3	10/10
2000	3,3	10/10
1000	3,0	10/10
200	2,3	7/10
100	2	6/10
50	1,7	3/10

Tablo 19. SPSS Probit analizi ile Diagnovital kitinin SARS-CoV-2 Alfa için LoD sonuçları

		Güven Sınırı					
	Olasılık	%95 Güven Sınırı Konsantrasyon_SC2_Alfa			%95 Güven Sınırı log(Konsantrasyon_SC2_Alfa)[a]		
		Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
PROBIT	,010	9,778	,007	28,952	,990	-2,146	1,462

	,020	12,659	,020	33,832	1,102	-1,699	1,529
	,030	14,912	,038	37,388	1,174	-1,415	1,573
	,040	16,868	,063	40,337	1,227	-1,203	1,606
	,050	18,647	,093	42,930	1,271	-1,030	1,633
	,060	20,308	,131	45,290	1,308	-,883	1,656
	,070	21,886	,176	47,484	1,340	-,754	1,677
	,080	23,402	,229	49,557	1,369	-,639	1,695
	,090	24,872	,292	51,538	1,396	-,535	1,712
	,100	26,307	,364	53,449	1,420	-,439	1,728
	,150	33,182	,905	62,405	1,521	-,043	1,795
	,200	39,907	1,854	71,062	1,601	,268	1,852
	,250	46,753	3,403	80,047	1,670	,532	1,903
	,300	53,896	5,819	89,908	1,732	,765	1,954
	,350	61,485	9,452	101,341	1,789	,976	2,006
	,400	69,673	14,732	115,421	1,843	1,168	2,062
	,450	78,631	22,108	134,001	1,896	1,345	2,127
	,500	88,570	31,884	160,465	1,947	1,504	2,205
	,550	99,766	43,944	201,075	1,999	1,643	2,303
	,600	112,593	57,609	267,229	2,052	1,760	2,427
	,650	127,586	72,001	379,540	2,106	1,857	2,579
	,700	145,553	86,662	577,303	2,163	1,938	2,761
	,750	167,790	101,816	943,727	2,225	2,008	2,975
	,800	196,572	118,295	1679,984	2,294	2,073	3,225
	,850	236,410	137,688	3367,121	2,374	2,139	3,527
	,900	298,198	163,375	8238,537	2,475	2,213	3,916
	,910	315,400	169,901	10247,986	2,499	2,230	4,011
	,920	335,213	177,163	12999,251	2,525	2,248	4,114
	,930	358,438	185,370	16896,567	2,554	2,268	4,228
	,940	386,284	194,833	22663,382	2,587	2,290	4,355
	,950	420,692	206,040	31706,076	2,624	2,314	4,501
	,960	465,053	219,817	47085,492	2,668	2,342	4,673
	,970	526,051	237,737	76656,063	2,721	2,376	4,885
	,980	619,698	263,410	146764,060	2,792	2,421	5,167
	,990	802,277	308,744	409664,453	2,904	2,490	5,612

a. Logarithm base = 10.

Tablo 20. SARS CoV-2 Alfa LoD Probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları

Konsantrasyon (kopya/mL)	Log 10 kopya/mL	Pozitiflik Oranı
37000	4,57	10/10
3700	3,57	10/10
370	2,57	10/10
185	2,27	7/10
46	1,66	0/10

Tablo 21. SPSS Probit analizi ile Diagnovital kitinin SARS-CoV-2 Omicron için LoD sonuçları

		Güven Sınırı					
	Olasılık	%95 Güven Sınırı Konsantrasyon_SC2_Omicron			%95 Güven Sınırı log(Konsantrasyon_SC2_Omicron)[a]		
		Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
PROBIT	,010	24,799	,233	49,507	1,394	-,632	1,695
	,020	29,405	,475	55,081	1,468	-,323	1,741
	,030	32,761	,745	59,026	1,515	-,128	1,771
	,040	35,537	1,044	62,240	1,551	,019	1,794
	,050	37,967	1,373	65,033	1,579	,138	1,813
	,060	40,165	1,732	67,552	1,604	,238	1,830
	,070	42,198	2,121	69,882	1,625	,327	1,844
	,080	44,105	2,543	72,074	1,644	,405	1,858
	,090	45,913	2,997	74,163	1,662	,477	1,870
	,100	47,644	3,485	76,176	1,678	,542	1,882
	,150	55,531	6,467	85,637	1,745	,811	1,933
	,200	62,721	10,461	94,974	1,797	1,020	1,978
	,250	69,627	15,616	105,039	1,843	1,194	2,021
	,300	76,474	22,054	116,677	1,884	1,343	2,067
	,350	83,418	29,809	131,012	1,921	1,474	2,117
	,400	90,590	38,760	149,698	1,957	1,588	2,175
	,450	98,116	48,573	175,207	1,992	1,686	2,244
	,500	106,132	58,763	211,134	2,026	1,769	2,325
	,550	114,803	68,871	262,624	2,060	1,838	2,419
	,600	124,339	78,653	337,289	2,095	1,896	2,528
	,650	135,029	88,125	447,254	2,130	1,945	2,651

	,700	147,291	97,500	613,541	2,168	1,989	2,788
	,750	161,776	107,134	875,907	2,209	2,030	2,942
	,800	179,588	117,547	1317,986	2,254	2,070	3,120
	,850	202,839	129,591	2144,615	2,307	2,113	3,331
	,900	236,419	145,021	3997,917	2,374	2,161	3,602
	,910	245,330	148,837	4652,475	2,390	2,173	3,668
	,920	255,392	153,033	5487,834	2,407	2,185	3,739
	,930	266,933	157,714	6583,385	2,426	2,198	3,818
	,940	280,440	163,033	8071,297	2,448	2,212	3,907
	,950	296,680	169,227	10188,423	2,472	2,228	4,008
	,960	316,967	176,692	13404,104	2,501	2,247	4,127
	,970	343,817	186,174	18794,912	2,536	2,270	4,274
	,980	383,063	199,348	29489,918	2,583	2,300	4,470
	,990	454,212	221,587	60101,337	2,657	2,346	4,779

a. Logarithm base = 10.

Tablo 22. RSV LoD probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları

Konsantrasyon (kopya/mL)	Log 10 kopya/mL	Pozitiflik Oranı
20700	4,32	10/10
2070	3,32	10/10
1276,66	3,10	9/10
160	2,2	5/10
80	1,9	3/10

Tablo 23. SPSS probit analizi ile Diagnovital kitinin RSV için LoD sonuçları

		Güven Sınırı					
	Olasılık	%95 Güven Sınırı Konsantrasyon_RSVB			%95 Güven Sınırı log10 (Konsantrasyon_RSVB)		
		Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
PROBIT	.010	7.339	.094	27.603	.866	-1.025	1.441
	.020	10.554	.211	35.306	1.023	-.676	1.548
	.030	13.290	.351	41.336	1.124	-.455	1.616
	.040	15.807	.513	46.589	1.199	-.290	1.668
	.050	18.201	.699	51.388	1.260	-.155	1.711
	.060	20.523	.910	55.895	1.312	-.041	1.747
	.070	22.801	1.145	60.202	1.358	.059	1.780

	.080	25.055	1.405	64.370	1.399	.148	1.809
	.090	27.297	1.693	68.440	1.436	.229	1.835
	.100	29.538	2.009	72.442	1.470	.303	1.860
	.150	40.951	4.060	92.119	1.612	.609	1.964
	.200	53.092	7.047	112.365	1.725	.848	2.051
	.250	66.339	11.220	134.293	1.822	1.050	2.128
	.300	81.030	16.893	158.971	1.909	1.228	2.201
	.350	97.533	24.438	187.714	1.989	1.388	2.273
	.400	116.290	34.290	222.364	2.066	1.535	2.347
	.450	137.863	46.923	265.669	2.139	1.671	2.424
	.500	162.999	62.822	321.904	2.212	1.798	2.508
	.550	192.718	82.446	397.905	2.285	1.916	2.600
	.600	228.471	106.224	504.922	2.359	2.026	2.703
	.650	272.408	134.643	662.110	2.435	2.129	2.821
	.700	327.887	168.488	903.844	2.516	2.227	2.956
	.750	400.498	209.287	1296.811	2.603	2.321	3.113
	.800	500.427	260.126	1985.580	2.699	2.415	3.298
	.850	648.789	327.540	3338.428	2.812	2.515	3.524
	.900	899.466	427.564	6571.356	2.954	2.631	3.818
	.910	973.315	454.721	7760.713	2.988	2.658	3.890
	.920	1060.429	485.716	9306.901	3.025	2.686	3.969
	.930	1165.242	521.705	11376.494	3.066	2.717	4.056
	.940	1294.594	564.432	14252.293	3.112	2.752	4.154
	.950	1459.737	616.680	18452.477	3.164	2.790	4.266
	.960	1680.867	683.284	25030.581	3.226	2.835	4.398
	.970	1999.141	773.705	36478.992	3.301	2.889	4.562
	.980	2517.415	910.419	60334.643	3.401	2.959	4.781
	.990	3620.288	1171.416	133935.618	3.559	3.069	5.127

Tablo 24. Influenza A LoD probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları

Konsantrasyon (copy/mL)	Log 10 Konsantrasyon	Pozitiflik Oranı
5566	3,74	10/10
556	2,74	10/10
323,33	2,5	9/10
80	1,9	5/10
5	0,7	0/10

Tablo 25. SPSS probit analizi ile Diagnovital kitinin Influenza A için LoD sonuçları

		Güven Sınırı					
	Olasılık	%95 Güven Sınırı Konsantrasyon_INFA			%95 Güven Sınırı log 10 (Konsantrasyon_INFA)		
		Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
PROBIT	.010	10.128	.044	31.539	1.006	-1.359	1.499
	.020	12.962	.092	36.871	1.113	-1.036	1.567
	.030	15.159	.147	40.752	1.181	-.831	1.610
	.040	17.053	.210	43.964	1.232	-.678	1.643
	.050	18.767	.280	46.784	1.273	-.553	1.670
	.060	20.362	.357	49.343	1.309	-.447	1.693
	.070	21.871	.443	51.719	1.340	-.354	1.714
	.080	23.316	.536	53.957	1.368	-.271	1.732
	.090	24.714	.638	56.090	1.393	-.195	1.749
	.100	26.074	.748	58.141	1.416	-.126	1.764
	.150	32.551	1.445	67.645	1.513	.160	1.830
	.200	38.829	2.428	76.607	1.589	.385	1.884
	.250	45.170	3.774	85.579	1.655	.577	1.932
	.300	51.743	5.586	94.934	1.714	.747	1.977
	.350	58.684	7.994	105.023	1.769	.903	2.021
	.400	66.130	11.168	116.254	1.820	1.048	2.065
	.450	74.232	15.325	129.177	1.871	1.185	2.111
	.500	83.174	20.734	144.601	1.920	1.317	2.160
	.550	93.194	27.721	163.803	1.969	1.443	2.214
	.600	104.611	36.648	188.908	2.020	1.564	2.276
	.650	117.885	47.875	223.630	2.071	1.680	2.350
	.700	133.699	61.686	274.771	2.126	1.790	2.439
	.750	153.154	78.277	355.505	2.185	1.894	2.551
	.800	178.167	97.921	493.598	2.251	1.991	2.693
	.850	212.523	121.542	756.833	2.327	2.085	2.879
	.900	265.315	152.156	1358.586	2.424	2.182	3.133
	.910	279.920	159.764	1573.372	2.447	2.203	3.197
	.920	296.700	168.154	1848.717	2.472	2.226	3.267
	.930	316.313	177.553	2211.596	2.500	2.249	3.345
	.940	339.754	188.292	2707.141	2.531	2.275	3.433
	.950	368.616	200.893	3416.700	2.567	2.303	3.534
	.960	405.674	216.242	4502.567	2.608	2.335	3.653

	.970	456.375	236.023	6340.134	2.659	2.373	3.802
	.980	533.715	264.099	10032.491	2.727	2.422	4.001
	.990	683.073	313.194	20817.764	2.834	2.496	4.318

Tablo 26. Influenza B LoD probit analizi için kullanılan konsantrasyonlar ve 10 tekrarlı çalışmada saptanan pozitiflik oranları

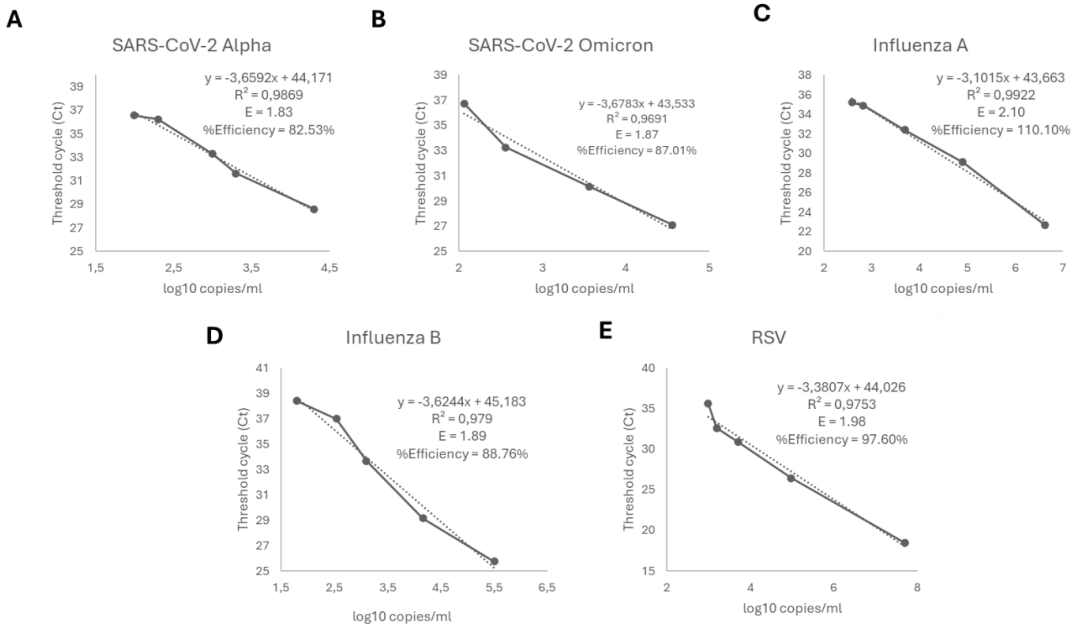
Konsantrasyon (copy/mL)	Log 10 Konsantrasyon	Pozitiflik Oranı
121060	5,08	10/10
12106	4,08	10/10
1057	3,02	10/10
350	2,54	4/10
63	1,8	1/10

Tablo 27. SPSS probit analizi ile Diagnovital kitinin Influenza B için LoD sonuçları

		Güven Sınırı					
	Olasılık	%95 Güven Sınırı Konsantrasyon_INFB			%95 Güven Sınırı log 10 (Konsantrasyon_INFB)		
		Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
	.010	33.512	1.758	83.214	1.525	.245	1.920
	.020	43.217	3.096	99.273	1.636	.491	1.997
	.030	50.786	4.426	111.228	1.706	.646	2.046
	.040	57.341	5.784	121.299	1.758	.762	2.084
	.050	63.292	7.185	130.272	1.801	.856	2.115
	.060	68.841	8.635	138.529	1.838	.936	2.142
	.070	74.106	10.139	146.287	1.870	1.006	2.165
	.080	79.161	11.701	153.685	1.899	1.068	2.187
	.090	84.057	13.322	160.817	1.925	1.125	2.206
PROBIT	.100	88.831	15.006	167.753	1.949	1.176	2.225
	.150	111.658	24.419	200.956	2.048	1.388	2.303
	.200	133.915	35.640	234.031	2.127	1.552	2.369
	.250	156.515	48.865	269.077	2.195	1.689	2.430
	.300	180.042	64.270	307.869	2.255	1.808	2.488
	.350	204.989	82.008	352.374	2.312	1.914	2.547
	.400	231.851	102.186	405.084	2.365	2.009	2.608
	.450	261.185	124.866	469.354	2.417	2.096	2.672
	.500	293.676	150.073	549.861	2.468	2.176	2.740
	.550	330.209	177.851	653.301	2.519	2.250	2.815

	.600	371.988	208.343	789.583	2.571	2.319	2.897
	.650	420.733	241.920	974.051	2.624	2.384	2.989
	.700	479.032	279.350	1231.935	2.680	2.446	3.091
	.750	551.039	322.064	1608.044	2.741	2.508	3.206
	.800	644.031	372.693	2190.513	2.809	2.571	3.341
	.850	772.410	436.419	3179.705	2.888	2.640	3.502
	.900	970.898	525.280	5149.772	2.987	2.720	3.712
	.910	1026.039	548.417	5795.420	3.011	2.739	3.763
	.920	1089.497	574.367	6592.795	3.037	2.759	3.819
	.930	1163.812	603.933	7601.630	3.066	2.781	3.881
	.940	1252.817	638.301	8918.219	3.098	2.805	3.950
	.950	1362.666	679.341	10708.996	3.134	2.832	4.030
	.960	1504.092	730.237	13290.307	3.177	2.863	4.124
	.970	1698.229	797.088	17352.570	3.230	2.902	4.239
	.980	1995.632	893.975	24779.359	3.300	2.951	4.394
	.990	2573.605	1067.780	43583.442	3.411	3.028	4.639

SARS-CoV-2 Alfa, SARS-CoV-2 Omicron, influenza A, influenza B ve RSV için viral kopya dilüsyonları ile Ct grafikleri incelendiğinde, sırasıyla R^2 değerleri ve PCR verimlilikleri şu şekildedir: 0.9869 – %82.53, 0.9691 – %87.01, 0.9922 – %110.10, 0.9790 – %88.76 ve 0.9753 – %97.60 (Şekil 2).



Şekil 2. Log10 10^1 ile 10^7 kopya/mL arasındaki nükleik asit konsantrasyonları için Ct değerlerini gösteren genel standart eğri. Eğim çizgisi için logaritmik denklem ve R^2 değerleri gösterilmektedir. A: SARS-CoV-2 Alfa, B: SARS-CoV-2 Omicron, C: Influenza A, D: Influenza B, E: RSV

4.2.2. Analitik Özgüllük

Valide edilen Diagnovital kiti ile hiçbir negatif örnek ve diğer solunum yolu virüsleri için pozitif olan hiçbir örnek pozitif olarak tespit edilmediğinden, analitik özgüllük %100 olarak belirlenmiştir.

4.2.3. Kesinlik

Diagnovital qRT-PCR testinin çalışma içi ve çalışmalar arası tekrarlanabilirlik analizleri her bir virüs için farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir (Tablo 28).

Tablo 28. Diagnovital RT-PCR kitinin SARS-CoV-2 Alfa, Influenza A, Influenza B ve RSV için çalışma içi ve çalışmalar arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Örnek	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma	Ortalama	SD	%CV	
SC2 Alfa – 1000 kopya/mL	32,90	33,09	33,70	33,23	0,41	1,25	Çalışma İçi
	33,23	33,58	31,95	32,92	0,85	2,60	Çalışmalar Arası
SC2 Alfa – 200 kopya/mL	37,80	35,79	36,83	36,80	1,00	2,73	Çalışma İçi
	36,80	37,31	35,14	36,41	1,13	3,11	Çalışmalar Arası
INFA – 4140 kopya/mL	32,1	32,04	32,39	32,17	0,187	0,581	Çalışma İçi
	32,17	32,39	31,87	32,12	0,26	0,81	Çalışmalar Arası
INFA – 556 kopya/mL	33,51	34,11	34,89	34,17	0,69	2,02	Çalışma İçi
	34,17	33,68	32,51	33,45	0,85	2,54	Çalışmalar Arası
INFA – 323 kopya/mL	34,47	34,79	36,29	35,18	0,97	2,76	Çalışma İçi
	35,18	34,34	39,32	36,28	2,66	7,34	Çalışmalar Arası

INFB – 12106 kopya/mL	31,42	31,40	31,01	31,27	0,23	0,74	Çalışma İçi
	31,27	31,93	32,66	31,95	0,69	2,16	Çalışmalar Arası
INFB – 1057 kopya/mL	34,31	33,85	35,12	34,42	0,64	1,86	Çalışma İçi
	34,42	36,86	35,71	35,66	0,67	1,89	Çalışmalar Arası
RSV – 4281 kopya/mL	30,99	30,84	31,4	31,07	0,07	0,25	Çalışma İçi
	31,07	31,4	30,95	31,14	0,26	0,86	Çalışmalar Arası
RSV – 1292 kopya/mL	34,27	34,20	36,54	35,00	1,33	3,80	Çalışma İçi
	35,00	33,32	36,21	34,84	1,45	4,16	Çalışmalar Arası

SARS-CoV-2 Alfa varyantında 1000 kopya/mL ve 200 kopya/mL konsantrasyonlar değerlendirilmiş ve % CV, çalışma içi 1,25-2,73 arasında, çalışmalar arası ise 2,60-3,11 arasında bulunmuştur. Influenza A'da üç farklı konsantrasyonda (323, 556, ve 4140 kopya/mL) %CV belirlenmiştir. Birlikte değerlendirildiğinde, influenza A için tekrarlanabilirlik analizinde %CV, çalışma içi 0,58 – 2,76; çalışmalar arası 0,811-7,34 arasında bulunmuştur.

Influenza B'de iki farklı konsantrasyonda (1057 ve 12106 kopya/mL) %CV belirlenmiştir. Birlikte değerlendirildiğinde, influenza B için %CV, çalışma içi 0,74 – 1,86; çalışmalar arası 1,89 - 2,16'dır.

RSV'de iki farklı konsantrasyonda (1292 ve 4281 kopya/mL) %CV belirlenmiştir. Birlikte değerlendirildiğinde, RSV için %CV, çalışma içi 0,25 - 3,80 ; çalışmalar arası 0,86 – 4,16'dır.

Üreticinin 3xLoD olacak şekilde tek konsantrasyonda gerçekleştirdiği tekrarlanabilirlik sonuçları: SARS-CoV-2 (468 kopya/mL) için %CV 0,595-1,28 arasında, INFA/B (3000 kopya/mL) için %CV 0,34 - 1,02 ve RSV (3000 kopya/mL) için %CV 0,478 - 0,98 arasındadır.

4.2.4. Doğruluk

Doğruluk çalışmalarında, SARS-CoV-2, InfA, InfB ve RSV için pozitif örneklerin sırasıyla %100, %95.1, %97.5 ve %94.8'i Diagnovital testi tarafından doğru bir şekilde tespit edilmiştir. Ct değeri >33 olan 5 örnekte yanlış negatiflik tespit edilmiştir. Kappa analizi sonucu SARS-CoV-2, Influanza A, Influenza B ve RSV için κ değeri sırayla 1.000, 0.958, 0.983 ve 0.965 (p=0,000) idi. 0.80'in üzerindeki kappa istatistikleri, mükemmel olarak kabul edilir (76). Üç QCMD EQA panel örneğinin tamamı doğru bir şekilde tanımlanmıştır (Şekil 3).

Sample Code	Sample Content	Sample Code	Sample Content	Sample Code	Sample Content
RESPI22C1-01	Influenza virus B (Victoria)	RESPII22C1-01	Enterovirus D68	RESPIII22C1-01	Legionella pneumophila sg1 (ST47)
RESPI22C1-02	Influenza virus B (Yamagata)	RESPII22C1-02	Coronavirus NL63	RESPIII22C1-02	Streptococcus pneumoniae
RESPI22C1-03	Influenza virus A H1N1 (pdm09)	RESPII22C1-03	Parainfluenza virus type 1	RESPIII22C1-03	Legionella pneumophila sg1 (ST47)
RESPI22C1-04	Influenza (type A) & Respiratory Syncytial Virus (type A)	RESPII22C1-04	Metapneumovirus type A1	RESPIII22C1-04	Negative
RESPI22C1-05	Respiratory Syncytial Virus (type B)	RESPII22C1-05	Adenovirus Type 1	RESPIII22C1-05	Legionella pneumophila sg1 (ST62)

Şekil 3. QCMD 2022 solunum dış kalite kontrol paneli (RESPI22C1, RESPII22C1, RESPIII22C1) panel içeriği

Multipleks Etkinlik

Multipleks çalışmasında elde edilen Ct değerlerinden singleplex çalışmasında elde edilen Ct değerleri çıkarıldığında, ortalama fark 0.8552 olarak bulunmuştur (min: -1.52 – max: 3.41 SD: 1.33) (Tablo 29).

Tablo 29. Virüslerin singleplex ve multipleks kombinasyon çalışmasındaki Ct değerleri

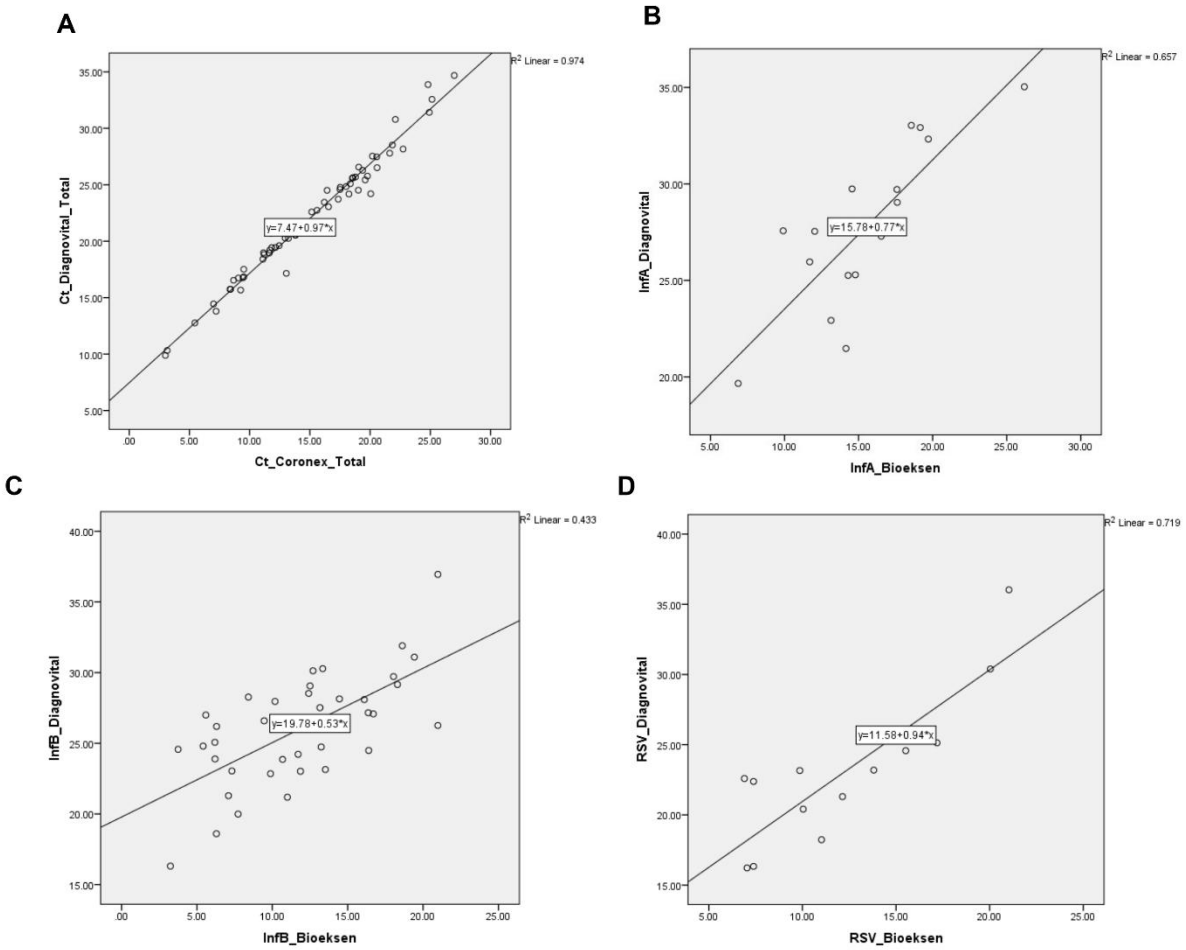
Karışım	Virus tipi	Ct singlepleks test	Ct multipleks test
Karışım1	SC2	15.87	17.12
	InfA	14.26	14.32

	RSV	18.25	19.73
Karışım2	SC2	19.22	20.39
	InfA	31.54	33.52
	RSV	30.57	29.12
Karışım3	SC2	19.22	19.57
	InfA	31.54	34.95
	RSV	21.98	23.01
Karışım4	SC2	19.22	20.64
	InfA	17.64	20.00
	RSV	30.57	28.99
Karışım5	SC2	19.22	20.26
	InfB	18.97	19.51
	RSV	21.40	22.05
Karışım6	SC2	15.87	17.58
	RSV	21.29	21.71
Karışım7	InfB	24.52	22.93
	RSV	18.25	19.79
Karışım8	SC2	17.38	18.59
	InfB	24.52	23.64

Kit Karşılaştırma Çalışması

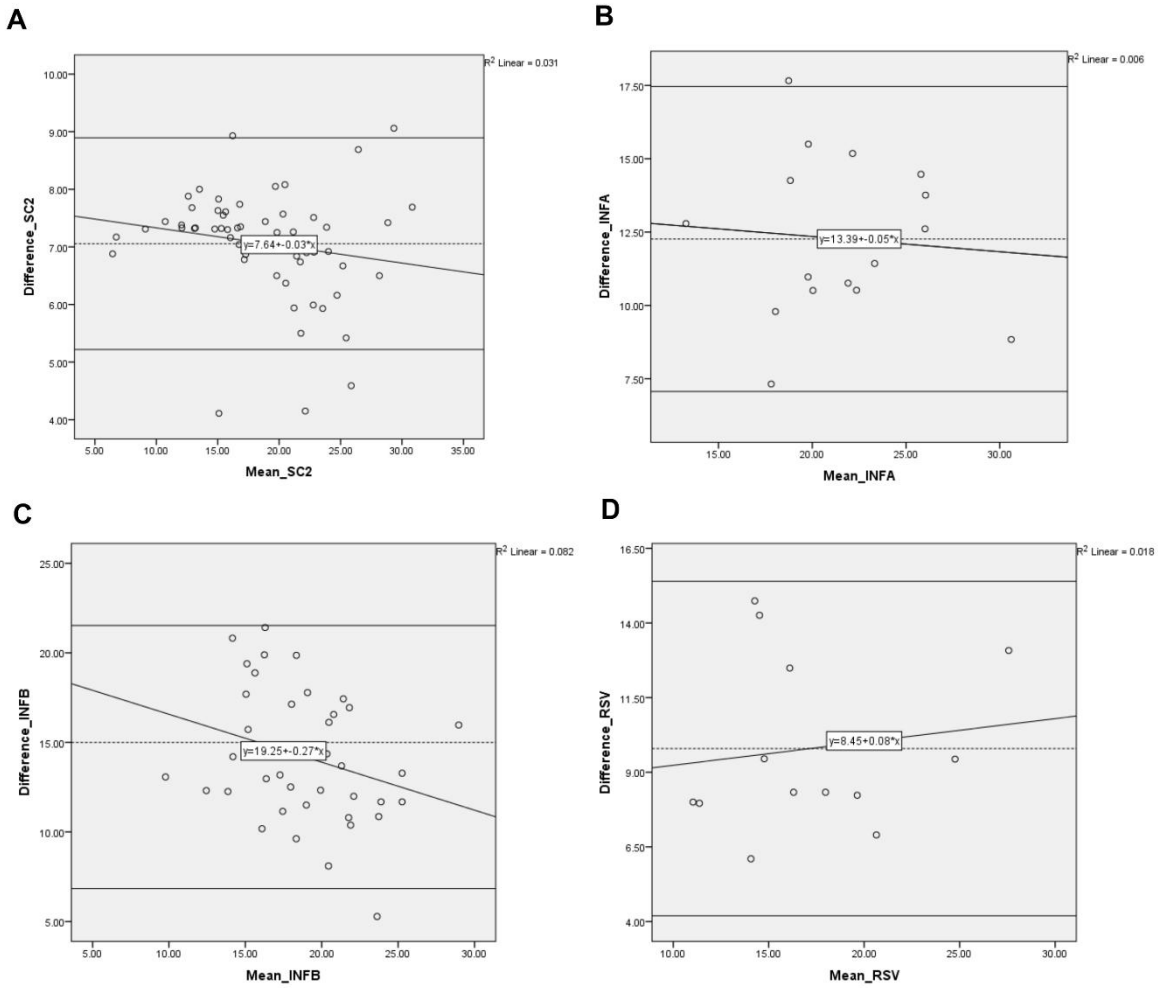
Validasyonu yapılan Diagnovital multipleks testi, rutin tanı performansını belirlemek amacıyla laboratuvarda halihazırda kullanılan iki ticari test ile hasta örnekleri ile karşılaştırılmıştır. SARS-CoV-2 için DS Coronex Kit ve influenza A, influenza B, RSV için Bio-Speedy Respiratory Tract Kit ile test edilen nazofarengeal

sürüntü örnekleri seçilmiştir. Seçilen grup, 61 SARS-CoV-2, 17 influenza A, 38 influenza B ve 13 RSV pozitif örnekten oluşmuş ve yeni Diagnovital testi ile analiz edilmiştir. Karşılaştırılan testlerin Ct değerleri Şekil 4'de gösterilmektedir.



Şekil 4. Test edilen virüse göre Diagnovital testi ve karşılaştırma testi ile elde edilen Ct değerleri. A: SARS-CoV-2, B: Influenza A, C: Influenza B, D: RSV

Diagnovital testi ve karşılaştırma testi ile elde edilen Ct değerleri arasındaki farkları görselleştirmek için Bland-Altman grafiği oluşturulmuştur. Bland-Altman analizi, dört virüs için de Diagnovital ve karşılaştırma testinden elde edilen Ct değerleri arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir.

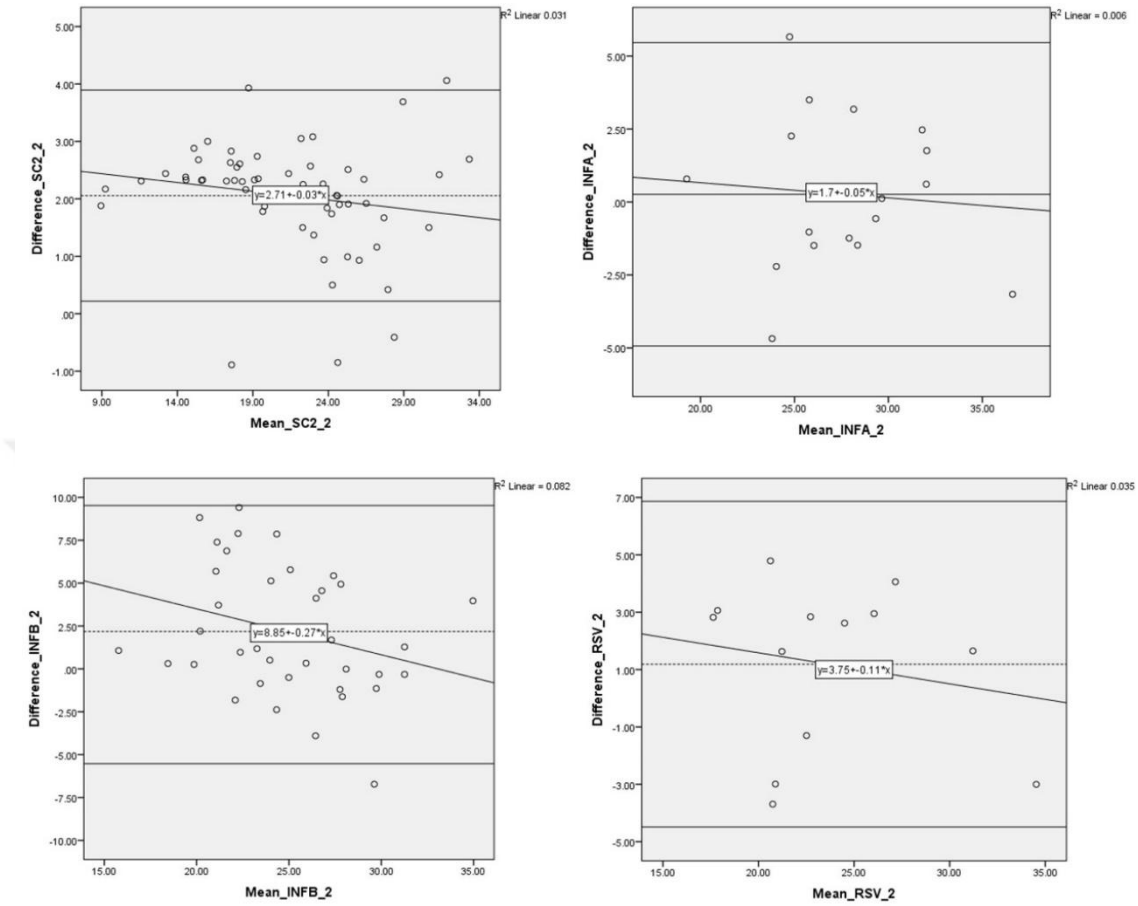


Şekil 5. Diagnovital kiti ve karşılaştırma kiti ile SARS-CoV-2, influenza a, influenza b ve RSV için elde edilen Ct değerlerine ait Bland-Altman grafikleri.

Valide edilen Diagnovital kiti ile karşılaştırma yapılan kitler arası Ct değerlerindeki ortalama farklar sırasıyla SARS-CoV-2 (A) için 7,05 (%95 CI: 5,22-8,89), influenza a (B) için 12,26 (%95 CI: 7,06-17,46), influenza B (C) için 14,18 (95% CI: 6,84-21,52) ve RSV (D) için 9,79 (%95 CI: 4,19-15,39) olarak bulunmuştur. Bu farklar, Coronex testinde SARS-CoV-2 için ilk 5 döngüde ve Bioeksen testinde influenza A, influenza B ve RSV için ilk 12 touchdown döngüsünde sinyal toplanmamasından kaynaklanmaktadır.

Coronex testinde ilk 5 ve Bioeksen testinde ilk 12 döngüde sinyal toplanmadığı için, bu sonuçlardan 5 ve 12 çıkarılarak analiz tekrar edilmiştir. Bu durumda yapılan Ct'ler arası ortalama farklar SARS-CoV-2, influenza A, influenza B ve RSV için

sırasıyla 2,05 (%95 CI: 0,22-3,89), 0,26 (%95 CI: -4,94-5,46), 2,18 (%95 CI: -5,16-9,53) ve 1,19 (%95 CI: -4,49-6,86) bulunmuştur (Şekil 6).



Şekil 6. Diagnovital kiti ve karşılaştırma kiti ile SARS-CoV-2, influenza a, influenza b ve RSV için elde edilen Ct değerlerine ait Bland-Altman grafikleri (*touchdown* döngü farkları çıkarılmış)

Bland-Altman analizinde, y ekseni kesişim değeri, iki ölçüm yöntemi arasındaki sabit bir farkın varlığını gösterir. Eğer y ekseni kesişim değeri 0'a yakınsa, bu iki test yöntemi arasında önemli bir fark olmadığı anlamına gelir. Eğer y ekseni kesişim değeri 0'dan önemli ölçüde farklıysa, bu, yöntemler arasında bir sapma olduğunu gösterebilir. Blant-Altman analizinde önemli olan bir diğer parametre ise grafiğin eğimidir. Bland-Altman grafiğinde eğim, iki ölçüm yöntemi arasındaki farkların, ölçümlerin ortalamasıyla nasıl değiştiğini göstermektedir. Eğer eğim sıfırdan farklıysa, bu, ölçüm farklarının ölçüm büyüklüğüne bağlı olarak sistematik bir değişim gösterdiğini, yani ölçüm büyüklüğü arttıkça veya azaldıkça iki yöntem arasındaki farkın da arttığını veya azaldığını ifade eder. Bu durum, iki yöntem arasında orantılı bir bias (önyargı) olduğunu gösterir (114).

Influenza A için Bland-Altman analizi, eğimin 0'dan anlamlı derecede farklı olmadığını gösterdi (-0,052, %95 güven aralığı: -0,408 ila 0,304) ve y-kesişiminin 0'a yaklaştığını gösterdi (1,700, %95 güven aralığı: -8,245 ila 11,644, p=0,721). SARS-CoV-2 için Bland-Altman analizi, eğimin 0'dan anlamlı derecede farklı olmadığını gösterdi (-0,031, %95 güven aralığı: -0,075 ila 0,14), ancak y-kesişimi (2,712, %95 güven aralığı: 1,724 ila 3,700) 0'dan anlamlı derecede farklıydı (p=0,00). Influenza B için Bland-Altman analizi, eğimin 0'dan anlamlı derecede farklı olmadığını gösterdi (-0,268, %95 güven aralığı: -0,570 ila 0,035), ancak y-kesişimi (8,853, %95 güven aralığı: 1,228 ila 16,479) 0'dan anlamlı derecede farklıydı (p=0,024). RSV için Bland-Altman analizi, eğimin 0'dan anlamlı derecede farklı olmadığını gösterdi (-0,108, %95 güven aralığı: -0,487 ila 0,271) ve y-kesişiminin 0'a yaklaştığını gösterdi (3,747, %95 güven aralığı: -5,412 ila 12,906, p=0,387).

Bununla birlikte, Bland-Altman grafiğindeki eğim değerlerinin tüm testler için 0’dan anlamlı derecede farklı olmaması, bu testlerin birbiri yerine kullanılabileceğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

COVID-19 salgını, mikrobiyolojik tanı gerektiren önemli solunum yolu virüslerini ayırt edebilen uygun maliyetli ve hızlı multipleks testlere olan ihtiyacı bir kez daha vurgulamıştır. Valide edilen Diagnovital kiti, SARS-CoV-2, InfA, InfB ve RSV için eş zamanlı bir test sağlayarak bu ihtiyaca yanıt vermiştir.

Bu çalışma, testin SARS-CoV-2 Alfa ve Omicron varyantlarını ve influenza A/B ve RSV'yi tespit etmedeki analitik duyarlılığının, üretici tarafından belirtilen beklenen aralıkta olduğunu buldu. Bu bulgular, testin tanı ve tedavi için bu patojenleri tespit etmede güvenilir olduğunu göstermektedir (60). Multipleks PCR'de, birden fazla primer-prob seti rekabet nedeniyle amplifikasyon verimliliğini etkileyebilir ve bu da her bir hedefin tekli bir teste kıyasla daha az verimli amplifikasyonuyla sonuçlanabilir. Çapraz dimerizasyon veya spesifik olmayan bağlanma gibi etkileşimler de döngü eşiği (Ct) değerlerini artırabilir. Bu, multipleks analizlerin, singlepleks muadillerine göre hedefi biraz daha yüksek Ct değerlerinde tespit edebileceği ve daha düşük duyarlılığı yansıtabileceği anlamına gelir (117,118). Çalışmamızda analiz edilen Diagnovital kitinin multipleks etkililik çalışmalarında, tüm hedef virüsler, singlepleks analizlere kıyasla minimal Ct varyasyonu (+1 ile +3 arasında) olan karışık örneklerde tespit edildi. Bu, analizin multipleks formatının her patojen için tespit duyarlılığını önemli ölçüde tehlikeye atmadığını ve hedeflenen virüslerin eş zamanlı test edilmesi için kullanımını desteklediğini gösterir.

Çalışmanın dijital PCR ile kantitatif materyal eldesi kısmında, içerdikleri virüs konsantrasyonu bilinmeyen influenza A, influenza B ve RSV RNA pozitif hasta numunelerinden hazırlanan havuzlarda dPCR sistemi kullanılarak, viral yük belirlenmiştir. Elde edilen kantitatif materyal ile ticari bir multipleks gerçek zamanlı PCR testinin analitik duyarlılık ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu proje, tanısal mikrobiyolojide nadir baş vurulan dPCR sisteminin kantitatif materyal elde etme alanında kullanımına bir örnek olmuştur. Çalışma ile influenza A, influenza B ve RSV için çip bazlı bir dijital PCR sistemi valide edilmiş ve kullanımdaki avantaj ve kısıtlılıklar gösterilmiştir. Aynı zamanda dPCR ile qRT-PCR sistemleri tekrarlanabilirlik yönünden karşılaştırılmıştır.

Dijital PCR, kantitasyon yapmak için dış standartlara ve standart eğrisine ihtiyaç duymayan, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip bir yöntemdir. Bu yönü ile ideal bir

kantitasyon sistemi olarak kabul edilmektedir. (13). Ancak "Dijital PCR Deneylerinin Yayınlanması için Minimum Bilgi (dMIQE)" rehberinde belirtildiği gibi, dPCR çalışmalarına ait yayınlarda özellikle çalışmalar arası tekrarlanabilirlik verileri sınırlıdır (37). Oysa dPCR tekniğinin rutin kullanımda yer alabilmesi için tekrarlanabilirlik verilerinin bilinmesi önemlidir. Çalışmamızda hem çalışma içi, hem de çalışmalar arası dPCR deneylerinin verileri sunulmuştur. Damlacıklı dijital PCR'ın influenza A, B ve RSV için kullanıldığı bir yayında, tekrarlanabilirlik değerlendirildiğinde, düşük viral yüklü örneklerde %CV'nin bir miktar arttığı, ancak yine de genellikle 1'in altında saptandığı bildirilmiştir. Sadece influenza B'nin 4,6 log kopya/mL içeren dilüsyonunda %CV 8,37 saptanmıştır (32). Çalışmamızda ortalama 4,5 log10 kopya/mL (4,1 - 4,8) dilüsyonda üç virüs için de çalışma içi ve çalışmalar arası tekrarlanabilirliğin (%CV) 1'e yakın (0,27 – 1,34) olduğu görülmektedir. Viral yük düştükçe %CV'de bir miktar artış saptanmıştır. Çalışmalar arası tekrarlanabilirlik verileri, klinik tanı laboratuvarlarında hasta sonuçlarının doğru belirlenmesinin yanı sıra, kalite kontrol çalışmalarında kullanılan materyalin karşılaştırılabilir sonuçlar vermesi açısından da önemlidir (119).

Dijital PCR ile tanısal mikrobiyolojide sık kullanılan qRT-PCR sonuçlarının karşılaştırma çalışmasında, dPCR'ın, daha düşük bir varyasyon katsayısına (%CV) sahip olduğu saptanmıştır. HIV ile çip bazlı dPCR sistemi kullanılanılarak yapılan bir çalışmada, dPCR için %CV oranı %11,9 iken, qPCR ile %24,7 olarak bulunmuştur (120). Influenza virüs ile damlacıklı dPCR sistemi kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise, her dilüsyon için dPCR ile qPCR'a göre istatistiksel anlamlılık gösterecek ölçüde ($p<0,05$) daha düşük %CV değerleri bulunmuştur (121). Bu bulgular, dPCR'ın qPCR'a kıyasla daha iyi tekrarlanabilirlik sunabileceğini göstermektedir.

Influenza A, B ve RSV için dPCR testinde beklenen ve gözlenen sonuçlar arasındaki lineer regresyon grafiklerinde r^2 değerleri $\geq 0,99$ saptanmıştır. Sonuçlar, dPCR testinin viral yük belirlemede yüksek doğruluğunu ifade etmektedir.

Çalışmamızda, dPCR yönteminin validasyon analizleri de yapılmıştır. Her üç virüs için dPCR LoD değerleri birbirine yakın ve 1,18—1,97 log10 kopya/mL arasında saptanmıştır. Hijano ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada, influenza A, B ve RSV için damlacık esaslı bir dijital PCR sistemi kullanılmıştır (32). Bu çalışmada

incelenen üç virüs için LoD birbirine yakın olarak 3,17 - 3,38 log10 kopya/mL olarak belirlenmiştir. dPCR sistemleri, amplifikasyon verimliliğinden etkilenmeden ve incelenen mikroorganizmadan bağımsız olarak, benzer LoD sağlayabilmektedir (122). Çalışmamız ile Hijano ve ark. deneylerinde, etkenden bağımsız LoD değerlerinin saptanması bu özelliğin sonucu olarak kabul edilebilir.

Dijital PCR sistemleri damlacıklı ve çip bazlı sistemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Damlacıklı sistemler, geniş çalışma konsantrasyon aralığı ile avantaj sunar (123). Çip bazlı sistemler konsantrasyon aralığı daha dar olmakla birlikte kullanımı daha kolaydır (32). Çalışmamızda kullanılan çip bazlı dPCR sisteminde, çok düşük ve çok yüksek konsantrasyonlu örneklerde sonuç alınamamasının sebebi, çip bazlı sistemlerin önceden belirlenmiş sınırlı bir çalışma alanına (bölme/partisyon) sahip olmasıdır. Çalışmamızda kullanılan dPCR sisteminde 26 bin partisyon kullanılmıştır. Bu nedenle, çip bazlı dPCR sistemlerinde, çalışma öncesi template hacminin belirlenmesi veya gerekli dilüsyonların yapılması için nükleik asit konsantrasyonu hakkında ön bilgiye sahip olunması gerekmektedir.

Viruslar için kantitatif referans materyallerinin elde edilmesinde, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği yüksek dPCR yönteminin kullanılması önerilmektedir (38,39,124). Dijital PCR'ın RSV (125) ve maymun çiçeği virüsü (MPXV) (126) referans materyalleri oluşturmak için kullanıldığı yayınlar bulunmaktadır. Kantitatif standartlar/referans materyalleri, virüs tespit testlerinin performansını değerlendirmek, kantitatif tanı testleri geliştirmek, tanı ve tedaviyi yönlendirmede doğruluğu artırmak için kullanılabilir (127).

Bu çalışmada çip esaslı dijital PCR yönteminin yüksek viral yüklü örneklerde sonuç veremediği saptanmıştır. Hipotetik olarak partisyon başına düşmesi gereken maksimum değer 5 kopyadır. Bu nedenle dPCR reaksiyonuna giren nükleik asit miktarı florometrik ya da spektrofotometrik teknikler ile ölçülmeli ve template hacmi belirlenmelidir. Giriş örnek hacmi, örnekteki virus konsantrasyonu düştükçe arttırılmalıdır.

Çalışmada karşılaştırılan dPCR ile qRT-PCR testlerinin sonuçları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır. Ancak yöntemsel farkların testlerin özellikle LoD ve tekrarlanabilirlik sonuçlarını etkileme olasılığı bulunduğu hatırlanmalıdır.

Son olarak, bu projede, dPCR ile, Diagnovital qRT-PCR test kitinin validasyonu için gereken kantitatif standartlar/referans materyaller elde edimiştir. Elde edilen influenza A, influenza B ve RSV kantitatif standartları, qRT-PCR testinin LoD ve tekrarlanabilirlik değerlerini belirlemede kullanılmıştır.

Diagnovital qRT-PCR test kitinin validasyon çalışmasının analitik duyarlılık sonuçlarında, SARS-CoV-2 alfa ve omikron varyantları ve Influenza A için analitik duyarlılık değerleri birbirine yakındı. Ancak, Influenza B ve RSV için analitik duyarlılıkların sırasıyla 1362 ve 1459 kopya/mL olduğu bulundu. Influenza A için kullanılan primer/prob setlerinin diğer viruslardan bir set daha fazla kullanılması, Influenza A' da daha düşük tespit limiti bulmamıza sebep olmuş olabilir. Literatürdeki benzer çalışmalar karşılaştırıldığında, ticari olarak temin edilebilen multipleks kitler kullanan çalışmalarda Influenza A/B ve RSV için yaklaşık 50 kopya/mL LoD değerlerinin bildirildiği gözlenmektedir (128). Çalışmamızda gözlemlenen LoD değerleri yaklaşık bir log daha yüksektir. Sonuç olarak, Diagnovital kiti özellikle Influenza A/B ve RSV' nin düşük viral yüklerine sahip örneklerde yanlış negatif sonuçlar üretebilir. Öte yandan, 4 virüsün tümü için %80'den fazla PCR verimliliği, analitik performans açısından uygunluğunu göstermektedir (129).

Kitin analitik özgüllüğü, test doğrulamasının kritik bir yönü, hedef dışı solunum virüslerinde reaktivite eksikliği ile doğrulanmıştır. Bu bulgu, Diagnovital testinin, dolaşan diğer virüslerden etkilenmeyen hedef patojenleri tespit etmek için bir araç olarak kullanılmasını desteklemektedir. Hassasiyet çalışmaları, varyasyon katsayısının (%CV) üreticinin spesifikasyonlarından biraz daha yüksek olmasına rağmen, klinik uygulamalar için kabul edilebilir tekrarlanabilirliği gösteren %5 eşiğinin altında kaldığını göstermiştir (130).

Doğruluk çalışması, özellikle influenza A/B ve RSV için yüksek Ct değerlerine (Ct > 33) sahip örneklerde yanlış negatiflerin ortaya çıkabileceğini gösterdi. Bu bulgu, düşük viral yükleri olan vakalarda sonuçların dikkatli yorumlanmasının önemini vurgular. Test, daha düşük viral yüklerde bile SARS-CoV-2'yi tespit etmede güçlü bir performans gösterdi. Ayrıca yapılan kappa analizinde bulunan 0,80'den yüksek kappa değerleri, rutinde kullanılan kitlerle valide edilen Diagnovital kiti arasında mükemmel uyum olduğunu göstermektedir. Zira literatürde, 0,81-1,00 arası kappa değerleri çok yüksek uyum olarak gösterilir (131).

Diagnovital kiti, rutin teşhislerde kullanılan diğer ticari olarak mevcut testlerle kıyaslanabilir bir performans gösterdi. Bland-Altman analizi, Diagnovital ve karşılaştırma testleri arasında Ct değerlerinde önemli bir sapma göstermedi ve bu yöntemlerin hedeflenen virüslerin klinik teşhisi için birbirinin yerine kullanılabileceğini düşündürdü. Ancak, Ct değerlerindeki küçük farklılıklar, testlerin ilk sinyal toplama döngülerindeki değişikliklere atfedildi.

Genel olarak, doğrulama çalışması, Diagnovital Influenza A/B, SARS-CoV-2, RSV Multipleks Real-Time PCR Kitinin bu solunum yolu virüslerini teşhis etmek için güvenilir ve etkili bir araç olduğunu göstermektedir. Özellikle birden fazla patojenin eş-dolaşımı sırasında, etkili hasta yönetimi ve halk sağlığı yanıtları için hızlı ve doğru ayrımın elzem olduğu durumlarda değerlidir. Bununla birlikte, düşük viral yük örneklerinde olası yanlış negatifler gibi sınırlamalarının farkında olmak, klinik uygulamada sonuçların doğru yorumlanması için çok önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel olarak, doğrulama çalışması, Diagnovital Influenza A/B, SARS-CoV-2, RSV Multipleks Real-Time PCR Kitinin bu solunum yolu virüslerini teşhis etmek için güvenilir ve etkili bir araç olduğunu göstermektedir. Özellikle birden fazla patojenin eş-dolaşımı sırasında, etkili hasta yönetimi ve halk sağlığı yanıtları için hızlı ve doğru ayrımın elzem olduğu durumlarda değerlidir. Bununla birlikte, düşük viral yük örneklerinde olası yanlış negatifler gibi sınırlamalarının farkında olmak, klinik uygulamada sonuçların doğru yorumlanması için çok önemlidir.

Çalışmamızda, içerdikleri virüs konsantrasyonu bilinmeyen influenza A, influenza B ve RSV RNA pozitif hasta numunelerinde dPCR sistemini kullanılarak, viral yük belirlenmiştir. Elde edilen kantitatif materyal ile ticari bir multipleks gerçek zamanlı PCR testinin analitik duyarlılık ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu proje, tıbbi mikrobiyolojide nadir baş vurulan dPCR sisteminin kantitatif materyal elde etme alanında kullanımına bir örnek olmuştur. Çalışma ile influenza A, influenza B ve RSV için çip bazlı bir dijital PCR sistemi valide edilmiş ve kullanımdaki avantaj ve kısıtlılıklar gösterilmiştir. Aynı zamanda dPCR ile qRT-PCR sistemleri tekrarlanabilirlik yönünden karşılaştırılmıştır.

Dijital PCR, kantitatif standartlar elde etmede doğruluğu ve tekrarlanabilirliği yüksek, güvenilir bir yöntemdir. Elde edilen kantitatif standartlar ile viral yük belirlemeye yönelik tanı yöntemleri geliştirmek ve/veya bu tür testlerin yöntem onayı analizlerini gerçekleştirmek mümkündür.

Çip esaslı dijital PCR yöntemi yüksek viral yüklü örneklerde sonuç verememektedir. Hipotetik olarak partisyon başına düşmesi gereken maksimum değer 5 kopyadır. Bu nedenle dPCR reaksiyonuna giren nükleik asit miktarı florometrik ya da spektrofotometrik teknikler kullanılarak ölçülmeli ve template hacmi belirlenmelidir. Giriş örnek hacmi, örnekteki virus konsantrasyonu düştükçe arttırılmalıdır.

Bu çalışmada karşılaştırılan dPCR ile qRT-PCR testlerinin sonuçları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır. Ancak yöntemsel farkların testlerin özellikle LoD ve tekrarlanabilirlik sonuçlarını etkileme olasılığı bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Niesters HGM. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. Clinical Microbiology and Infection [Internet]. 2004;10(1):5-11. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14636880

2. Candotti D, Temple J, Owusu-Ofori S, Allain JP. Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. J Virol Methods [Internet]. 2004;118(1):39-47. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093404000199

3. Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. Crit Rev Clin Lab Sci. 2011;48(5-6):217-49.

4. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, vd. Real-time reverse transcription–polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. Emerg Infect Dis. 2004;10(2):311.

5. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. Int J Mol Sci. 2011;12(11):7861-84.

6. Sidoti F, Bergallo M, Costa C, Cavallo R. Alternative molecular tests for virological diagnosis. Mol Biotechnol. 2013;53:352-62.

7. Gleerup D, Trypsteen W, Fraley SI, De Spiegelaere W. Digital PCR in Virology: Current Applications and Future Perspectives. Mol Diagn Ther. 2024;1-12.

8. Tsongalis GJ. Branched DNA Technology in Molecular Diagnostics. Am J Clin Pathol [Internet]. 01 Eylül 2006;126(3):448-53. Erişim adresi: https://doi.org/10.1309/90BU6KDXANFLN4RJ

9. Bustin SA, Kessler HH. 5. Amplification and detection methods. Içinde: Kessler HH, editör. De Gruyter; 2014. s. 63-84. Erişim adresi: https://doi.org/10.1515/9783110328127.63

10. Hayden R, Persing DH. Diagnostic molecular microbiology. Curr Clin Top Infect Dis. 2001;21:323-48.

11. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital pcr. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(16):9236-41.

12. Tong Y, Shen S, Jiang H, Chen Z. Application of digital PCR in detecting human diseases associated gene mutation. Cellular Physiology and Biochemistry. 2017;43(4):1718-30.

13. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. Clin Chem. 2015;61(1):79-88.

14. Sundberg SO, Wittwer CT, Gao C, Gale BK. Spinning disk platform for microfluidic digital polymerase chain reaction. Anal Chem. 2010;82(4):1546-50.

15. Hatch AC, Fisher JS, Tovar AR, Hsieh AT, Lin R, Pentoney SL, vd. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. Lab Chip. 2011;11(22):3838-45.

16. Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. PLoS One. 2008;3(8):e2876.

17. Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, Cowen S, Scott DJ, Foy CA. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. Anal Chem. 2011;83(17):6474-84.

18. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, vd. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem. 2012;84(2):1003-11.

19. Pablo-Fontecha V, Hernández-Illán E, Reparaz A, Asensio E, Morata J, Tonda R, vd. Quantification of rare somatic single nucleotide variants by droplet digital PCR using SuperSelective primers. Sci Rep. 2023;13(1):18997.

20. Liu W, Wang C, Pan F, Shao J, Cui Y, Han D, vd. Clinical application of a multiplex droplet digital PCR in the rapid diagnosis of children with suspected bloodstream infections. Pathogens. 2023;12(5):719.

21. Javier SC, Fernandez-Gonzalez A, Jones GM, Redshaw N, Beck J, Berger AW, vd. AN INTERNATIONAL INTER-LABORATORY DIGITAL PCR STUDY DEMONSTRATES 1 HIGH REPRODUCIBILITY FOR THE MEASUREMENT OF A RARE SEQUENCE VARIANT 2.

22. Whale AS, Huggett JF, Cowen S, Speirs V, Shaw J, Ellison S, vd. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. Nucleic Acids Res. 2012;40(11):e82-e82.

23. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. Sci Rep. 2017;7(1):2409.

24. Weaver S, Dube S, Mir A, Qin J, Sun G, Ramakrishnan R, vd. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. Methods. 2010;50(4):271-6.

25. Karon BS, Donato LJ, Bridgeman AR, Blommel JH, Kipp B, Maus A, vd. Analytical sensitivity and specificity of four point of care rapid antigen diagnostic tests

for SARS-CoV-2 using real-time quantitative PCR, quantitative droplet digital PCR, and a mass spectrometric antigen assay as comparator methods. Clin Chem. 2021;67(11):1545-53.

26. Shehata HR, Li J, Chen S, Redda H, Cheng S, Tabujara N, vd. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed. PLoS One. 2017;12(8):e0182872.

27. Brazelton De Cárdenas JN, Hayden RT. Applications of Digital PCR in Clinical Microbiology. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology: Volume 2: Applications. 2018;685-98.

28. Risberg B, Tsui DWY, Biggs H, de Almagro ARVM, Dawson SJ, Hodgkin C, vd. Effects of collection and processing procedures on plasma circulating cell-free DNA from cancer patients. The Journal of Molecular Diagnostics. 2018;20(6):883-92.

29. Nixon G, Garson JA, Grant P, Nastouli E, Foy CA, Huggett JF. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus. Anal Chem. 2014;86(9):4387-94.

30. Salipante SJ, Jerome KR. Digital PCR—an emerging technology with broad applications in microbiology. Clin Chem. 2020;66(1):117-23.

31. He B, Yang Q. Updates in laboratory identification of invasive fungal infection in neonates. Microorganisms. 2023;11(4):1001.

32. Hijano DR, Brazelton de Cardenas J, Maron G, Garner CD, Ferrolino JA, Dallas RH, vd. Clinical correlation of influenza and respiratory syncytial virus load measured by digital PCR. PLoS One. 2019;14(9):e0220908.

33. Jacobs BKM, Goetghebeur E, Clement L. Impact of variance components on reliability of absolute quantification using digital PCR. BMC Bioinformatics. 2014;15:1-13.

34. Berden P, Wiederkehr RS, Lagae L, Michiels J, Stakenborg T, Fauvart M, vd. Amplification efficiency and template accessibility as distinct causes of rain in digital PCR: Monte Carlo modeling and experimental validation. Anal Chem. 2022;94(45):15781-9.

35. Witte AK, Mester P, Fister S, Witte M, Schoder D, Rossmanith P. A systematic investigation of parameters influencing droplet rain in the Listeria monocytogenes prfA assay-reduction of ambiguous results in ddPCR. PLoS One. 2016;11(12):e0168179.

36. Majumdar N, Banerjee S, Pallas M, Wessel T, Hegerich P. Poisson plus quantification for digital PCR systems. Sci Rep. 2017;7(1):1-10.

37. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, vd. The Digital MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Digital PCR E xperiments. Clin Chem. 2013;59(6):892-902.

38. Bhat S, Emslie KR. Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials. Biomol Detect Quantif. 2016;10:47-9.

39. Zhang K, Lin G, Li J. Quantitative nucleic acid amplification by digital PCR for clinical viral diagnostics. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2016;54(9):1427-33.

40. Kirkland PD, Frost MJ. The impact of viral transport media on PCR assay results for the detection of nucleic acid from SARS-CoV-2. Pathology. 2020;52(7):811-4.

41. Gunson RN, Bennett S, Maclean A, Carman WF. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. Journal of Clinical Virology. 2008;43(4):372-5.

42. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002;30(6):1292-305.

43. Molenkamp R, van der Ham A, Schinkel J, Beld M. Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics. J Virol Methods. 2007;141(2):205-11.

44. Hanson KE, Couturier MR. Multiplexed molecular diagnostics for respiratory, gastrointestinal, and central nervous system infections. Clinical Infectious Diseases. 2016;63(10):1361-7.

45. Rickert AM, Lehrach H, Sperling S. Multiplexed real-time PCR using universal reporters. Clin Chem. 2004;50(9):1680-3.

46. Huang Q, Zheng L, Zhu Y, Zhang J, Wen H, Huang J, vd. Multicolor combinatorial probe coding for real-time PCR. PLoS One. 2011;6(1):e16033.

47. Landes MB, Neil RB, McCool SS, Mason BP, Woron AM, Garman RL, vd. The frequency and seasonality of influenza and other respiratory viruses in T ennessee: two influenza seasons of surveillance data, 2010–2012. Influenza Other Respir Viruses. 2013;7(6):1122-7.

48. Azar MM, Landry ML. Detection of influenza A and B viruses and respiratory syncytial virus by use of Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA)-waived point-of-care assays: a paradigm shift to molecular tests. J Clin Microbiol. 2018;56(7):10-1128.

49. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non–influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. Arch Intern Med. 2003;163(4):487-94.

50. Hu B, Ge X, Wang LF, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. Virol J. 2015;12:1-10.

51. Zhang N, Zheng BJ, Lu L, Zhou Y, Jiang S, Du L. Advancements in the development of subunit influenza vaccines. Microbes Infect. 2015;17(2):123-34.

52. Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, vd. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. J Clin Microbiol. 2005;43(1):36-40.

53. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):1-15.

54. Lim XF, Lee CB, Pascoe SM, How CB, Chan S, Tan JH, vd. Detection and characterization of a novel bat-borne coronavirus in Singapore using multiple molecular approaches. Journal of General Virology. 2019;100(10):1363-74.

55. Wang N, Luo C, Liu H, Yang X, Hu B, Zhang W, vd. Characterization of a new member of alphacoronavirus with unique genomic features in Rhinolophus bats. Viruses. 2019;11(4):379.

56. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, vd. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Eurosurveillance. 2012;17(39).

57. Huang P, Wang H, Cao Z, Jin H, Chi H, Zhao J, vd. A rapid and specific assay for the detection of MERS-CoV. Front Microbiol. 2018;9:1101.

58. Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. Coronavirus replication and reverse genetics. 2005;1-30.

59. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, vd. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The lancet. 2020;395(10224):565-74.

60. Martinez ME. The calendar of epidemics: Seasonal cycles of infectious diseases. PLoS Pathog. 2018;14(11):e1007327.

61. Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of respiratory viral infections. Annu Rev Virol. 2020;7(1):83-101.

62. Gorbalenya A, Baker S, Baric RS, de Groot R, Drosten C, Gulyaeva AA, vd. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat Microbiol. 2020;5(4):536-44.

63. Wu X, Cai Y, Huang X, Yu X, Zhao L, Wang F, vd. Co-infection with SARS-CoV-2 and influenza A virus in patient with pneumonia, China. Emerg Infect Dis. 2020;26(6):1324.

64. Dumkow LE, Worden LJ, Rao SN. Syndromic diagnostic testing: a new way to approach patient care in the treatment of infectious diseases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2021;76(Supplement_3):iii4-11.

65. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002;30(6):1292-305.

66. Nascimento MS, de Souza AV, de Souza Ferreira AV, Rodrigues JC, Abramovici S, da Silva Filho LVF. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. Clinics. 2010;65(11):1133-7.

67. Chen JHK, Lam HY, Yip CCY, Wong SCY, Chan JFW, Ma ESK, vd. Clinical evaluation of the new high-throughput Luminex NxTAG respiratory pathogen panel assay for multiplex respiratory pathogen detection. J Clin Microbiol. 2016;54(7):1820-5.

68. Feng Z shan, Zhao L, Wang J, Qiu F zhou, Zhao M chuan, Wang L, vd. A multiplex one-tube nested real time RT-PCR assay for simultaneous detection of respiratory syncytial virus, human rhinovirus and human metapneumovirus. Virol J. 2018;15:1-7.

69. Huzly D, Korn K, Bierbaum S, Eberle B, Falcone V, Knöll A, vd. Influenza A virus drift variants reduced the detection sensitivity of a commercial multiplex nucleic acid amplification assay in the season 2014/15. Arch Virol. 2016;161:2417-23.

70. Sam SS, Caliendo AM, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Hill CE, Kraft CS. Evaluation of performance characteristics of panther fusion assays for detection of respiratory viruses from nasopharyngeal and lower respiratory tract specimens. J Clin Microbiol. 2018;56(8):10-1128.

71. Li J, Mao NY, Zhang C, Yang MJ, Wang M, Xu WB, vd. The development of a GeXP-based multiplex reverse transcription-PCR assay for simultaneous detection of sixteen human respiratory virus types/subtypes. BMC Infect Dis. 2012;12:1-8.

72. Deng J, Ma Z, Huang W, Li C, Wang H, Zheng Y, vd. Respiratory virus multiplex RT-PCR assay sensitivities and influence factors in hospitalized children with lower respiratory tract infections. Virol Sin. 2013;28:97-102.

73. Zhang N, Wang L, Deng X, Liang R, Su M, He C, vd. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. J Med Virol. 2020;92(4):408-17.

74. Regulations C of F. Title 42. Public health. Chapter I. Public Health Service, Department of Health and Human Services. Subchapter F. Quarantine, inspection, licensing. Part 71. Foreign quarantine. Subpart F. Importations. § 71.54. Import regulations for infectious biological agents infectious substances …; 2013.

75. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. Journal of clinical virology. 2007;40(2):93-8.

76. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):550-76.

77. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, vd. The MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments. Oxford University Press; 2009.

78. Vogeser M, Brüggemann M, Lennerz J, Stenzinger A, Gassner UM. Laboratory-developed tests in the new European Union 2017/746 regulation: opportunities and risks. C. 68, Clinical Chemistry. Oxford University Press; 2022. s. 40-2.

79. Szalados JE. Clinical Labs: CLIA and Other Evolving Challenges. The Medical-Legal Aspects of Acute Care Medicine: A Resource for Clinicians, Administrators, and Risk Managers. 2021;463-77.

80. Sciacovelli L, Aita A, Padoan A, Antonelli G, Plebani M. ISO 15189 accreditation and competence: a new opportunity for laboratory medicine. J Lab Precis Med. 2017;2(9).

81. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. Adv Clin Chem. 2019;90:215-81.

82. Lippi G, Plebani M, Simundic AM. Quality in laboratory diagnostics: from theory to practice. Biochem Med (Zagreb). 2010;20(2):126-30.

83. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev. 2000;13(4):559-70.

84. Hedman J, Rådström P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. PCR detection of microbial pathogens. 2013;17-48.

85. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med. 2002;8(6):257-60.

86. Jing R, Wang H, Ju S, Cui M. Reference materials for molecular diagnostics: Current achievements and future strategies. Clin Biochem. 2018;56:11-7.

87. Code US. Title 21-Food and Drugs. Legal Information Institute: Ithaca, NY, USA. 2011;304-6.

88. AWARE T, DOCUMENTATION TOPS. Medical laboratories—Particular requirements for quality and competence. Int Organ. 2011;2011:6.

89. Wilson JA. Verification and validation of multiplex nucleic acid assays. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

90. Organization WH. Glossary of terms for biological substances used for texts of the requirements. Expert committee on biological standardization WHO unpublished document BS/951793 Geneva (Switzerland): World Health Organization. 1995;

91. Kwasniewski L, Bojanowski C. Principles of Verification and Validation. Journal of Structural Fire Engineering [Internet]. 01 Ocak 2015;6(1):29-40. Erişim adresi: https://doi.org/10.1260/2040-2317.6.1.29

92. Smith M. Validating real-time polymerase chain reaction (PCR) assays. Encyclopedia of virology. 2021;35.

93. Diehl P, Prudhomme S, Lévesque M. A review of benchmark experiments for the validation of peridynamics models. Journal of Peridynamics and Nonlocal Modeling. 2019;1:14-35.

94. Tholen DW, Linnet K, Kondratovich M, Armbruster DA, Garrett PE, Jones RL, vd. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. CLSI EP17-A. 2004;24:34.

95. Saah AJ, Hoover DR. "Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. American College of Physicians; 1997.

96. Huang S, Wang T, Yang M. The evaluation of statistical methods for estimating the lower limit of detection. Assay Drug Dev Technol. 2013;11(1):35-43.

97. Westgard JO, Barry PL, Quam EF. Basic method validation: training in analytical quality management for healthcare laboratories. Westgard Quality Corporation; 1999.

98. Åsberg A, Johnsen H, Mikkelsen G, Hov GG. Using probit regression to disclose the analytical performance of qualitative and semi-quantitative tests. Scand J Clin Lab Invest. 2016;76(7):515-9.

99. Yamamura K, Mano J, Shibaike H. Optimal definition of the limit of detection (LOD) in detecting genetically modified grains from heterogeneous grain lots. Qual Technol Quant Manag. 2019;16(1):36-53.

100. I JO. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. JSTOR; 1947.

101. Vaks JE, Hemyari P, Rullkoetter M, Santulli MJ, Schoenbrunner N. Verification of claimed limit of detection in molecular diagnostics. J Appl Lab Med. 2016;1(3):260-70.

102. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2006;44(6):750-9.

103. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, Krouwer JS, Meier K. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline—second edition. Evaluation. 2004;24(25).

104. Normalización OI de. ISO 3534-1. Statistics. Vocabulary and symbols. Part 1: probability and general statistical terms. ISO; 1993.

105. Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, Krouwer JS, Meier K. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline—second edition. Evaluation. 2004;24(25).

106. Administration F and D. Guidance for industry on bioanalytical method validation. Fed Regist. 2001;66(100):28526.

107. Standardization ISO. In vitro Diagnostic Medical Devices—Measurement of Quantities in Biological Samples Metrological Traceability of Values Assigned to Calibrators and Control Materials. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. 2003;

108. Normalización OI de. ISO 3534-1. Statistics. Vocabulary and symbols. Part 1: probability and general statistical terms. ISO; 1993.

109. Carey RN, Anderson FP, George H, Hartmann AE, Janzen VK, Kallner A, vd. User verification of performance for precision and trueness. Approved guideline: CLSI. 2006;

110. Institute C and LS. User protocol for evaluation of qualitative test performance; approved guideline. CLSI document EP12-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute Wayne PA; 2008.

111. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia. 1999;1999:1654-5.

112. Charles KF, NG MHM, Chan MHL, Tai CWkl. ClinBiochemRev. Feb. 2007;28(1):11-7.

113. Rebrikov D V, Trofimov DY. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. Appl Biochem Microbiol. 2006;42:455-63.

114. Bland JM, Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. The lancet. 1986;327(8476):307-10.

115. Burns M, Valdivia H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. European Food Research and Technology. 2008;226:1513-24.

116. García-Alegría AM, Anduro-Corona I, Pérez-Martínez CJ, Guadalupe Corella-Madueño MA, Rascón-Durán ML, Astiazaran-Garcia H. Quantification of DNA through the NanoDrop spectrophotometer: methodological validation using standard reference material and Sprague Dawley rat and human DNA. Int J Anal Chem. 2020;2020(1):8896738.

117. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. PCR primer design. 2015;31-56.

118. Abbasi H, Nikoo HR, Fotouhi F, Khosravi A. Development of a robust TaqMan probe-based one-step multiplex RT-qPCR for simultaneous detection of SARS-CoV-2 and Influenza A/B viruses. BMC Microbiol. 2023;23(1):335.

119. Zhou D, Li Y, Li J, Yu J, Yang H, Wei H. Construction of lentivirus-based reference material for RT-PCR detection of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus and its application in external quality assessment. J Nanosci Nanotechnol. 2019;19(9):5510-6.

120. Renault C, Bolloré K, Pisoni A, Motto-Ros C, Van de Perre P, Reynes J, vd. Accuracy of real-time PCR and digital PCR for the monitoring of total HIV DNA under prolonged antiretroviral therapy. Sci Rep. 2022;12(1):9323.

121. Schwartz SL, Lowen AC. Droplet digital PCR: A novel method for detection of influenza virus defective interfering particles. J Virol Methods. 2016;237:159-65.

122. Huggett JF. The digital MIQE guidelines update: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020. Clin Chem. 2020;66(8):1012-29.

123. Wei C, Yu C, Li S, Meng J, Li T, Cheng J, vd. A droplet-based multivolume microfluidic device for digital polymerase chain reaction. Sens Actuators B Chem. 2022;371:132473.

124. Hayden RT. Primary quantitative reference standards for viral nucleic acids should be developed using digital polymerase chain reaction instead of consensus testing. C. 61, Journal of Clinical Microbiology. Am Soc Microbiol; 2023. s. e01338-22.

125. Niu C, Dong L, Zhang J, Wang D, Gao Y. Reference material development for detection of human respiratory syncytial virus using digital PCR. Anal Bioanal Chem. 2023;415(16):3131-5.

126. Yang J, Guo R, Li H, Chen G, Lin Y, Wang X, vd. Development of highly accurate digital PCR method and reference material for monkeypox virus detection. Anal Bioanal Chem. 2023;415(7):1333-7.

127. Zhou H, Liu D, Ma L, Ma T, Xu T, Ren L, vd. A SARS-CoV-2 reference standard quantified by multiple digital PCR platforms for quality assessment of molecular tests. Anal Chem. 2020;93(2):715-21.

128. Cheng A, Riedel S, Arnaout R, Kirby JE. Verification of the Abbott Alinity m Resp-4-Plex assay for detection of SARS-CoV-2, influenza A/B, and respiratory syncytial virus. Diagn Microbiol Infect Dis. 2022;102(2):115575.

129. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, vd. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Trends Food Sci Technol. 2014;37(2):115-26.

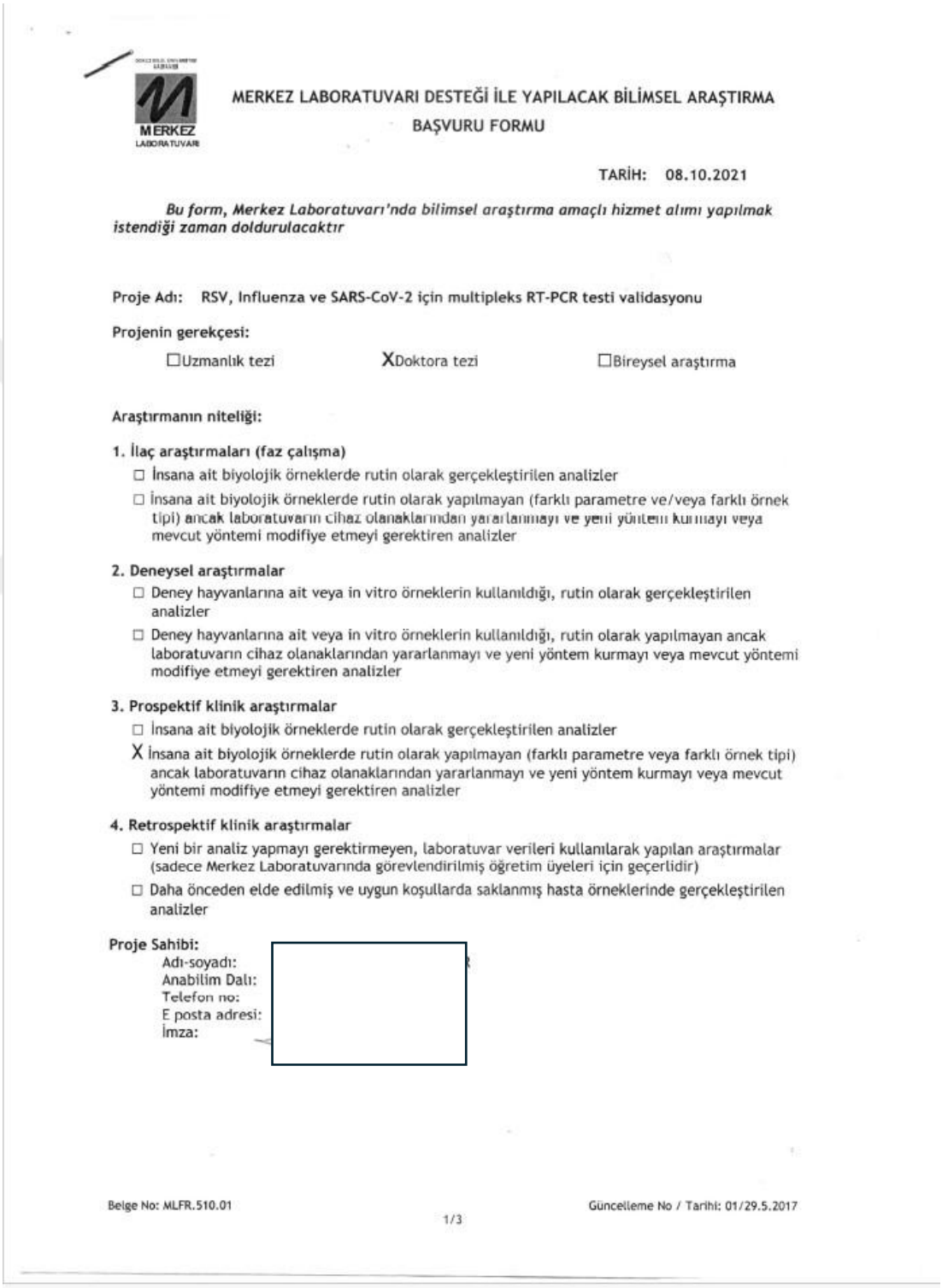
130. Borg I, Rohde G, Löseke S, Bittscheidt J, Schultze-Werninghaus G, Stephan V, vd. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. European Respiratory Journal. 2003;21(6):944-51.

131. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. Phys Ther. 2005;85(3):257-68.

8. EKLER

8.1.Uygulama İzni

EK 1. Merkez Laboratuvar Uygulama İzni



MERKEZ LABORATUVARI DESTEĞİ İLE YAPILACAK BİLİMSEL ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU

TARİH: 08.10.2021

Bu form, Merkez Laboratuvarı'nda bilimsel araştırma amaçlı hizmet alımı yapılmak istendiği zaman doldurulacaktır

Proje Adı: RSV, Influenza ve SARS-CoV-2 için multipleks RT-PCR testi validasyonu

Projenin gerekçesi:

☐Uzmanlık tezi X Doktora tezi ☐Bireysel araştırma

Araştırmanın niteliği:

1. İlaç araştırmaları (faz çalışma)

☐ İnsana ait biyolojik örneklerde rutin olarak gerçekleştirilen analizler

☐ İnsana ait biyolojik örneklerde rutin olarak yapılmayan (farklı parametre ve/veya farklı örnek tipi) ancak laboratuvarın cihaz olanaklarından yararlanmayı ve yeni yöntem kurmayı veya mevcut yöntemi modifiye etmeyi gerektiren analizler

2. Deneysel araştırmalar

☐ Deney hayvanlarına ait veya in vitro örneklerin kullanıldığı, rutin olarak gerçekleştirilen analizler

☐ Deney hayvanlarına ait veya in vitro örneklerin kullanıldığı, rutin olarak yapılmayan ancak laboratuvarın cihaz olanaklarından yararlanmayı ve yeni yöntem kurmayı veya mevcut yöntemi modifiye etmeyi gerektiren analizler

3. Prospektif klinik araştırmalar

☐ İnsana ait biyolojik örneklerde rutin olarak gerçekleştirilen analizler

X İnsana ait biyolojik örneklerde rutin olarak yapılmayan (farklı parametre veya farklı örnek tipi) ancak laboratuvarın cihaz olanaklarından yararlanmayı ve yeni yöntem kurmayı veya mevcut yöntemi modifiye etmeyi gerektiren analizler

4. Retrospektif klinik araştırmalar

☐ Yeni bir analiz yapmayı gerektirmeyen, laboratuvar verileri kullanılarak yapılan araştırmalar (sadece Merkez Laboratuvarında görevlendirilmiş öğretim üyeleri için geçerlidir)

☐ Daha önceden elde edilmiş ve uygun koşullarda saklanmış hasta örneklerinde gerçekleştirilen analizler

Proje Sahibi:
Adı-soyadı:
Anabilim Dalı:
Telefon no:
E posta adresi:
İmza:

Belge No: MLFR.510.01 1/3 Güncelleme No / Tarihi: 01/29.5.2017

MERKEZ LABORATUVARI

MERKEZ LABORATUVARI DESTEĞİ İLE YAPILACAK BİLİMSEL ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU

Proje Kapsamında DEÜML 'da gerçekleştirilecek olan işlemler:

☐Planlama

Araştırmanın başlangıç/bitiş tarihleri Kasım 2021/Şubat 2023

Hastaların/Örneklerin Laboratuvara geleceği gün/günler: Haftanın her günü gelmekte olan rutin test örnekleri

Hastaların/Örneklerin Laboratuvara geleceği saatler:Rutin uygulamaya ek bir talep yoktur

☐ Örnek alımı

Örnek sayısı: 350

Örnek tipiSolunum yolu örnekleri

Örnek tüpü/kabıSwab.

Projede Görev Alan Diğer Araştırmacıların Listesi:

Adı-Soyadı	Bölüm	Telefon no	E posta adresi

MERKEZ LABORATUVARI

MERKEZ LABORATUVARI DESTEĞİ İLE YAPILACAK BİLİMSEL ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU

PROJE İLE İLGİLİ KISA BİLGİ

Amaç ve Giriş: (en fazla 100 kelime)

Projemizde, influenza virüs, RSV ve SARS-CoV-2 yi eş zamalı test edebilen, yeni bir ticari multipleks PCR kitinin validasyonu yapılarak, rutinde kullanıma uygunluğu değerlendirilecektir. Biyolojik referans materyaller, kalite kontrol suşları ve gerçek hasta örnekleri kullanılarak analitik duyarlılık, analitik özgüllük, kesinlik (çalışma içi ve çalışmalar arası), doğruluk, karşılaştırma çalışmaları yapılacaktır

Gereç ve Yöntem:

Araştırmada DEU merkez laboratuvarına rutin PCR işlemi için gelmiş solunum yolu örnekleri ve ticari referans materyaller kullanılacaktır. RSV, influenza ve SARS-CoV-2 NAT standartları satın alınacaktır. Analitik duyarlılık, analitik özgüllük, doğruluk ve tekrarlanabilirlik deneyleri için standartların yanısıra 50 örnek kullanılacaktır. Ayrıca rutinde kulanılan yöntem ile karşılaştırma deneyleri için 300 örnek kullanılacaktır. Uygun koşullarda saklanmakta olan ve araştırılacak 3 virüs için pozitif ve negatif saptanmış örneklerden toplamda 350 tane kullanılacaktır. Analitik duyarlılık, analitik özgüllük, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve karşılaştırma deneyleri Rabenau ve ark. (Rabenau et al, 2007) tanımladığı kriterler esas alınarak çalışılacaktır. Örneklerin rutin testler ile saptanan sonuçları, SARS-CoV-2, influenza ve RSV için pozitif olup olmadığı ve pozitif olanların PCR Ct değerleri kullanılacaktır. Hastalarla ilişkili ek bir bilgi gerekmemektedir.

"Rabenau, H. F., Kessler, H. H., Kortenbusch, M., Steinhorst, A., Raggam, R. B., & Berger, A. (2007). Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. In Journal of Clinical Virology (Vol. 40, Issue 2, pp. 93-98). https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.07.009"

SONUÇ:

Uygundur.

Merkez Laboratuvarı Yönetimi tarafından doldurulacaktır.

ONAYLAYAN:

ADI SOYADI:

İMZA:

8.2.Etik Kurul Onayı

EK 2. Etik Kurul Onayı

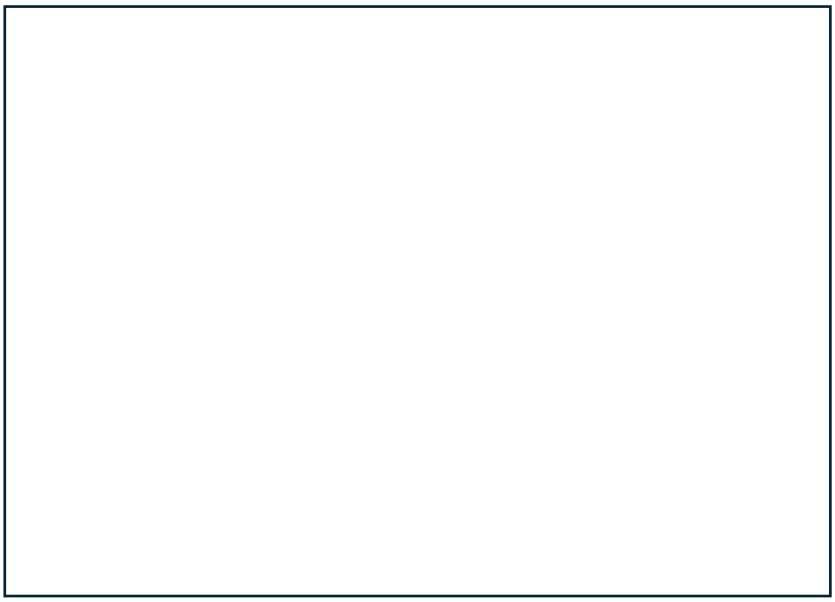
İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ

SAYI: B.30.2.İEÜSB.0.05.05-20-151 08.03.2022
KONU: Etik Kurul Kararı hk.

Sayın Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER,

07.03.2022 tarih ve 48 numaralı Etik Kurul toplantısında yöneticisi olduğunuz, İzmir Ekonomi Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı Öğretim Görevlisi Alihan BULGURCU ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Özgür APPAK'ın araştırmacı olarak görev aldığı **"RSV, Influenza ve SARS-CoV-2 için Multipleks RT-PCR testi Validasyonu"** konulu projeniz görüşülmüştür. Başvurunun etik açıdan uygun olduğu gerekçesiyle onaylanmasına, görüşmeye katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Gereği için bilginize sunarız.



Sakarya Caddesi, No:156 35330 Balçova - İzmir / TÜRKİYE • Tel: 0 (232) 279 25 25 PBX • 444 4 938 • Faks: 0 (232) 279 26 26

KATKI

T.C.
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI
Araştırma Destek Programları Başkanlığı

Sayı : B.14.2.TBT.0.06.03.02-161-354698 25/07/2023
Konu : 223S097 Numaralı Proje Karar Yazısı

Sayın Alihan BULGURCU

"1002-B Acil Destek Modülü" kapsamında Kurumumuza sunulan 223S097 numaralı ve "Influenza A/B Virüs Ve Rsv Validasyon Standartlarının Dijital Pcr Ile Kantitasyonu" başlıklı projenize ilişkin bilimsel değerlendirme süreci tamamlanmıştır.

Konunun uzmanı danışmanlar tarafından yapılan değerlendirmeler sonucunda proje önerinize destek verilmesine karar verildiğini bildirmekten memnuniyet duyarım (*).

Desteklenmesine karar verilen proje önerinizin ilgili mevzuat çerçevesinde, mali ve benzeri konularda değerlendirme çalışmalarına başlanmıştır. Süreç tamamlandığında projelere ait sözleşme ve diğer belgeler imzalanmak üzere tarafınıza gönderilecektir.

Başarınızı tebrik eder, saygılar sunarım.

S k

* Bir ilgi kariyer hayatı boyunca 1002-A Hızlı Destek Modülü ve 1002-B Acil Destek Modülü kapsamında toplamda en fazla beş kez proje yürütücüsü olarak görev alabilir.

ARDEB PROJE TAKİP SİSTEMİ

Kullanıcı İşlemleri | Geri Bildirim | ALİHAN BULGURCU | Çıkış

Proje Yürütücüsü | Proje Çıktıları ve Etkileri (Proje Performans Puanı/Ödülü) | İş Yüküm

YÜRÜRLÜKTEKİ VE SONUÇLANAN PROJELERİM

Desteklenen projenize ilişkin süreçlerde yapmanız gereken iş ve işlemler hakkında bilgi notu için tıklayınız.

Sayfada 10 kayıt göster Ara:

Proje No	Proje Adı	Başlama Tarihi	Proje Sorumlusu	Proje Durumu	Raporlar
223S097	Influenza A/B Virüs ve RSV Validasyon Standartlarının Dijital PCR ile Kantitasyonu	15/08/2023	RECEP EMRAH ÇEVİK	Sonuçlandı	

1 kayıttan 1 - 1 arası gösteriliyor İlk Önceki 1 Sonraki Son

ÖZGEÇMİŞ



ALİHAN BULGURCU

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2016 - Şu Anda (8 yıl 3 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MİKROBİYOLOJİ (DR)

01 Eylül 2010 - 01 Eylül 2013 (3 yıl 1 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MİKROBİYOLOJİ (YL)
Tez Başlığı: Türkiye Batı Bölgelerinde Hantavirus Araştırılması: Trakya Bölgesi Kemiricilerinde Hantavirus Varlığının Polimeraz Zincir Tepkimesi İle Araştırılması
Tez Konusu: Hantaviruslar, Üç Segmentli Genomları Negatif İplikli Olan Rna Viruslarıdır. Insanlarda Iki Önemli Sendroma Sebep Olurlar. Birincisi Asya Ve Avrupa' Da Görülen Renal Sendromlu Kanamalı Ateş (hfrs), Diğeri Ise Amerika' Da Hantavirus Pulmoner Sendromudur (hps). Hantaviruslar, Kemirici Türleri Tarafından Taşınırlar Ve Her Bir Kemirici Türü Bir Hantavirus Türüne Spesifiktir. Hantavirus Tanısı Için Serolojik Ve Moleküler Yöntemler Kullanılır. Bu Çalışmada, Trakya Bölgesi'nden Toplanan Kemiriciler Optimize Ettiğimiz Yuvalanmış-rt-pcr Yöntemi Kullanılarak Dobrava, Saarema Ve Puumala Virüs Varlığı Açısından Taranmıştır.
Tarih: 2013
Tez Danışmanı: İBRAHİM MEHMET ALİ ÖKTEM

23 Haziran 2006 - 23 Haziran 2010 (4 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ, BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.64 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Nisan 2016 - Şu Anda (8 yıl 8 ay) (Full Time)
Lecturer, İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU TIBBİ HİZMETLER VE TEKNİKLER BÖLÜMÜ TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ PR. (TAM BURSLU)

Ocak 2012 - Ocak 2014 (2 yıl 1 ay) (Full Time)
Expert , BİOMÉRİEUX DİAGNOSTİK MALZEMELERİ VE HİZMETLERİ TİCARET A.Ş. - İSTANBUL

Yabancı Dil Bilgileri

İTALYANCA (Okuma: Orta, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji -- Tıbbi Mikrobiyoloji

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji -- Viroloji

Anahtar Kelimeler

Moleküler Viroloji

Yöntem Validasyonu

Viral Metagenomik

Mutasyon Analizi

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

A. BULGURCU, Klinik Örneklerin Alınması ve Örnek Transferinde Uyulması Gereken Kurallar, T. DAL (Editörler), TIBBİ MİKROBİYOLOJİ(93 - 107), ISBN: 978-625-399-223-1, TÜRKİYE: Akademisyen Yayınevi, 16 Ağustos 2023, Kitapta Bölüm.

E. ORAL, F. B. ÖZKUL, H. DURMUŞ, E. FEYZİOĞLU DEMİR, A. BULGURCU, S. Y. ÖZGÜN & M. İ. ŞEMİN, Düşlerle Bilim, ISBN: 9789758789603, TÜRKİYE: Şener Ofset Matbaacılık, 01 Ağustos 2018, Kitap.

Makaleler

D. KELEŞ BARTIK, A. BULGURCU, E. FEYZİOĞLU DEMİR & M. İ. ŞEMİN, The effect of virtual laboratory simulations on medical laboratory techniques students' knowledge and vocational laboratory education, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI, 2022, 0250-4685, 47, 4, 529-537.

C. RODRIGUEZ, G. GRICOURT, E. KEYAERTS, L. FLORIAN, M. BEER, D. HOEPER, M. HUBER, A. C. M. KROES, J. BREUER & E. C. J. CLAAS et al., Benchmark of thirteen bioinformatic pipelines for metagenomic virus diagnostics using datasets from clinical samples, JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, 2021, 1386-6532, 141.

A. B. DEMİR, A. BULGURCU, O. APPAK & A. A. SAYINER, Analysis of Nucleotide Changes in RT-PCR Primer/Probe Binding Regions in SARS-CoV-2 Isolates Reported from Turkey, MİKROBİYOLOJİ BULTENİ, 2021, 0374-9096, 55, 3, 311-326.

Bildiriler

A. BULGURCU & A. A. SAYINER, Validation of a multiplex qRT-PCR assay for RSV, influenza A/B and
SARS-CoV-2, Poster Sunumu, 34th Congress of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 27 Nisan 2024, 30 Nisan 2024.

A. BULGURCU, Ö. APPAK & A. A. SAYINER, RSV, İnfluenza ve SARS-CoV-2 İçin Multipleks RT-PCRTesti Validasyonu, Sözlü Sunum, XL. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16 Kasım 2022, 20 Kasım 2022, 213 - 214.

A. BULGURCU, E. ŞAHİN, D. MEŞİNCİ, E. FEYZİOĞLU DEMİR & D. KELEŞ BARTIK, Evaluation of Online Laboratory Simulations in the Process of Distance Education by Medical Laboratory Students, Sözlü Sunum, SHMYO I. ULUSAL ÖĞRENCİ KONGRESİ, 25 Mayıs 2021, 26 Mayıs 2021, 81 - 83.

A. BULGURCU, H. AKÇIÇEK, S. Y. ÖZGÜN, E. FEYZİOĞLU DEMİR & D. KELEŞ BARTIK, Evaluation of the Psycho-Social Effects of the COVID-19 Pandemic on Medical Laboratory Technicians Working in Izmir Provincial Center, Sözlü Sunum, SHMYO I. ULUSAL ÖĞRENCİ KONGRESİ, 25 Mayıs 2021, 26 Mayıs 2021, 103 - 105.

A. BULGURCU, A. B. DEMİR, O. APPAK & A. A. SAYINER, Türkiye?den Bildirilen SARS-CoV-2 Tüm Genom Sekanslarında, RT-PCR Tanı Kitlerinin Analiz Bölgelerindeki Nükleotid Değişimlerinin Değerlendirilmesi, Sözlü Sunum, TMC 2020 Çevrim İçi Mikrobiyoloji Sempozyumu, 25 Aralık 2020, 27 Aralık 2020, 207 - 208.

D. KELEŞ BARTIK & A. BULGURCU, The Significance of Visual Laboratory Simulations in Distance Learning of Medical Laboratory Techniques, Sözlü Sunum, International Conference on New Horizons in Education, 03 Eylül 2020, 04 Eylül 2020.

A. BULGURCU & F. B. ÖZKUL, The Effect of Integrated Microbe Training on Microbe Perception in Early Childhood, Sözlü Sunum, IX. International Multidisciplinary Congress of Eurasia, 06 Ağustos 2019, 08 Ağustos 2019.

A. BULGURCU, Türkiye Batı Bölgelerinde Hantavirus Araştırılması: Trakya Bölgesi Kemiricilerinde Hantavirus Varlığının Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Araştırılması, Poster Sunumu, Uluslararası Xxxvıı. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 04 Kasım 2018, 08 Kasım 2018.

A. BULGURCU, Thermus Oshimai DSMZ 12092' den Elde Edilen Beta Galaktosidaz Enziminin Karakterizasyonu ve Farklı Proses Koşullarında İncelenmesi, Poster Sunumu, Vii. Biyomühendislik Günleri, 01 Kasım 2010, 05 Kasım 2010.

Projeler

DİĞER, ARAŞTIRMACI, "Metagenomic sequencing for diagnosing cases of unexplained cases encephalitis and fever in a Mediterranean region of Turkey, Izmir." (Devam ediyor) .

UYGULAMALI ARAŞTIRMA, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Influenza A/B virüs ve RSV validasyon standartlarının dijital PCR ile kantitasyonu, Yürütülen Kuruluş: SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) , 01 Ağustos 2023, 01 Şubat 2024.

ARAŞTIRMA PROJESİ, ARAŞTIRMACI, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Acil Servis Sağlık Çalışanlarında Metisilin Dirençli Staphylococcus Aureus (MRSA) Taşıyıcılığının Belirlenmesi, 01 Ocak 2023, 05 Mayıs 2023.

DİĞER, ARAŞTIRMACI, COVID-19 Pandemisinin İzmir İli Merkezinde Çalışan Tıbbi Laboratuvar Teknikerleri Üzerine Psiko-Sosyal Etkilerinin Değerlendirilmesi, 01 Nisan 2021, 01 Haziran 2021.

DİĞER, ARAŞTIRMACI, Uzaktan Eğitim Sürecinde Çevrimiçi Laboratuvar Simülasyonlarının Tıbbi Laboratuvar Öğrencileri Tarafından Değerlendirilmesi, 01 Nisan 2021, 01 Haziran 2021.

DİĞER, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Bilgisayar Ortamında Uygulanan Üç Boyutlu Sanal Laboratuvar Simülasyonunun Tıbbi Laboratuvar Mesleki Eğitimine Katkısının Değerlendirilmesi, 01 Temmuz 2020, 31 Ağustos 2020.

DOĞA EĞİTİMİ VE BİLİM OKULLARI, DİĞER, Düşlerle Bilim, Yürütülen Kuruluş: İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2018, 01 Aralık 2018.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, EMBO Short-Term Fellowship, Short-Term Fellowship, Ödül Alınan Kurum: European Molecular Biology Organization (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), ALMANYA, 18 Mart 2020.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Başarı Ödülü, Üstün Başarı, Ödül Alınan Kurum: TMMOB KİMYA MÜHENDİSLERİ ODASI, TÜRKİYE, 21 Haziran 2010.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Bölüm İkinciliği Ödülü, Üstün Başarı, Ödül Alınan Kurum: EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 15 Haziran 2010.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

2235097, Influenza A/B Virüs ve RSV Validasyon Standartlarının Dijital PCR ile Kantitasyonu, Yürütücü, Sonuçlandı, SBAG - Sağlık Bilimleri? Araştırma Destek Grubu, 1002 - Hızlı Destek / Hızlı Destek - B, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.08.2023 - (), Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.08.2023 - 15.02.2024.

118B279, Düşlerle Bilim, Eğitmen, Sonuçlandı, bi?li?m Ve Toplum Başkanlığı Destek Programları Müdürlüğü, Bilim ve Toplum / 4004 - Doğa Eğitimi ve Bilim Okulları, BİLİM TOPLUM, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.06.2018 - (), Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.06.2018 - 01.12.2018.

BİDEB Destekleri

ALİHAN BULGURCU, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 222B-A Son Sınıf Lisans Öğrencileri için Lisansüstü (Yüksek Lisans/Doktora) Burs Programı, Bursu Bitti (Mezun), 2010 - 1, 01.10.2010 - 31.08.2012.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0

1) Demir A B, **Bulgurcu A**, Appak Ö, Sayıner A.A. Analysis of Nucleotide Changes in RT-PCR Primer/Probe Binding Regions in SARS-CoV-2 Isolates Reported from Turkey. Mikrobiyol Bul 2021; 55(3):311-326/ doi: 10.5578/mb.20219803

EK 3. Doktora yeterlilik sınavı öncesi SCIE dergide yayınlanan makale



Analysis of Nucleotide Changes in RT-PCR Primer/Probe Binding Regions in SARS-CoV-2 Isolates Reported from Turkey

By: Demir, AB (Demir, Ayse Banu) [1] ; Bulgurcu, A (Bulgurcu, Alihan) [2] ; Appak, Ö (Appak, Ozgur) [3] ; Sayiner, AA (Sayiner, Ayca Arzu) [3]

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source: MIKROBIYOLOJI BULTENI
Volume: 55 Issue: 3 Page: 311-326
DOI: 10.5578/mb.20219803

Published: JUL 2021

Indexed: 2021-07-26

Document Type: Article

Abstract: The SARS-CoV-2 virus, which caused the COVID-19 epidemic, caused more than 55 million cases and nearly 1.5 million deaths worldwide. For the microbiological diagnosis of the disease, the most valid method is detecting the presence of the viral genome by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR). However, due to the nature of the RNA viruses, frequent mutations may affect the sensitivity of the analyses made on the genetic material of the virus, such as PCR. In this study, we aimed to investigate the mutations in the primer-probe binding regions of the rRT-PCR panels used in COVID-19 diagnosis. SARS-CoV-2 whole genome sequence data (n= 194) isolated from COVID-19 cases in Turkey and uploaded on GISAID database from the centers in Istanbul (n= 78), Ankara (n= 58), Kars (n= 47), Bursa (n= 2), Adiyaman (n= 2), Erciyes (n= 1) and Kocaeli (n= 1) between March 17-September 14, 2020 were analyzed. In order to determine the nucleotide changes, SARS-CoV-2 sequences from

Citation Network

In Web of Science Core Collection

2 Citations — Create citation alert

2 Times Cited in All Databases — + See more times cited

28 Cited References — → View Related Records

How does this document's citation performance compare to peers?

← Open comparison metrics panel

Data is from InCites Benchmarking & Analytics

You may also like...

Dumanlidag, D; Keles, D; Kosay, C; et al. Effects of vertebral fusion on levels of pro-inflammatory and catabolic mediators in a

MIKROBIYOLOJI BULTENI

Publisher: ANKARA MICROBIOLOGY SOC , HACETLEPE UNIV FACULTY MEDICINE DEPT MICROBIOLOGY, ANKARA, Turkiye, 06100

ISSN / eISSN: 0374-9096

Web of Science Core Collection: Science Citation Index Expanded

Additional *Web of Science* Indexes: Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Essential Science Indicators

Share This Journal

View profile page

* Requires free login.

2) C. Rodriguez, G. Gricourt, E. Keyaerts, L. Florian, M. Beer, D. Hoeper, M. Huber, A. C. M. Kroes, J. Breuer & E. C. J. Claas et al., Benchmark of thirteen bioinformatic pipelines for metagenomic virus diagnostics using datasets from clinical samples, JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, 2021, 141:1386-6532. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104908

EK 4. Doktora eğitimi sırasında yayınlanan SCI makale



Free Full Text From Publisher | Full Text Links | Export | Add To Marked List | 3 of 3

Benchmark of thirteen bioinformatic pipelines for metagenomic virus diagnostics using datasets from clinical samples

View associated Preprint

By: de Vries, JJC (de Vries, Jutte J. C.) [1] ; Brown, JR (Brown, Julianne R.) [2] ; Fischer, N (Fischer, Nicole) [4] ; Sidorov, IA (Sidorov, Igor A.) [1] ; Morfopoulou, S (Morfopoulou, Sofia) [3] ; Huang, JB (Huang, Jiabin) [4] ; Munnink, BBO (Munnink, Bas B. Oude) [5] ; Sayiner, A (Sayiner, Arzu) [6] ; Bulgurcu, A (Bulgurcu, Alihan) [7] ; Rodriguez, C (Rodriguez, Christophe) [7] ; Gricourt, G (Gricourt, Guillaume) [7] ; Keyaerts, E (Keyaerts, Els) [8] ; Beller, L (Beller, Leen) [8] ; Bachofen, C (Bachofen, Claudia) [9] ; Kubacki, J (Kubacki, Jakub) [12] ; Samuel, C (Samuel, Cordey) [10] ; Florian, L (Florian, Laubscher) [10] ; Dennis, S (Dennis, Schmitz) [11] ; Beer, M (Beer, Martin) [12] ; Hoeper, D (Hoeper, Dirk) [12] ; Huber, M (Huber, Michael) [13] ; Kufner, V (Kufner, Verena) [13] ; Zaheri, M (Zaheri, Maryam) [13] ; Lebrand, A (Lebrand, Aitana) [14] ; Papa, A (Papa, Anna) [15] ; van Boheemen, S (van Boheemen, Sander) [5] ; Kroes, ACM (Kroes, Aloys C. M.) [1] ; Breuer, J (Breuer, Judith) [2] , [3] ; Lopez-Labrador, FX (Xavier Lopez-Labrador, F.) [16] , [17] ; Claas, ECJ (Claas, Eric C. J.) [1] ...Less

View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

Source: JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY
Volume: 141
DOI: 10.1016/j.jcv.2021.104908

Article Number: 104908
Published: AUG 2021
Early Access: JUL 2021
Indexed: 2021-08-04
Document Type: Article
Jump to: Enriched Cited References

Abstract: Introduction: Metagenomic sequencing is increasingly being used in clinical settings for difficult to diagnose cases. The performance of viral metagenomic protocols relies to a large extent on the bioinformatic analysis. In this study, the European Society for Clinical Virology (ESCV) Network on NGS (ENNGS) initiated a benchmark of metagenomic

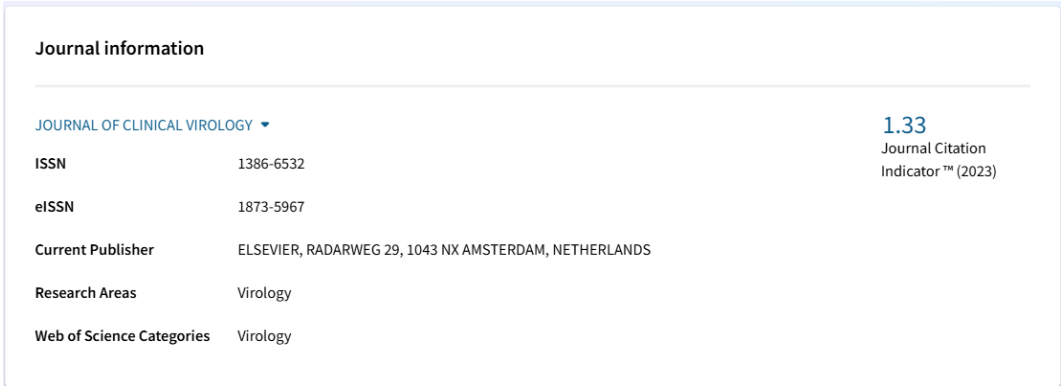
Citation Network

In Web of Science Core Collection
26 Citations — Create citation alert
26 Times Cited in All Databases — See more times cited — View citing preprints
44 Cited References — View Related Records

How does this document's citation performance compare to peers?
Open comparison metrics panel
Data is from InCites Benchmarking & Analytics

Citing items by classification
Breakdown of how this article has been mentioned, based on available citation context data and snippets from 16 citing item(s).

Background	11
Basis	4
Support	0
Differ	0
Discuss	9



Journal information

JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY

1.33 Journal Citation Indicator ™ (2023)

ISSN	1386-6532
eISSN	1873-5967
Current Publisher	ELSEVIER, RADARWEG 29, 1043 NX AMSTERDAM, NETHERLANDS
Research Areas	Virology
Web of Science Categories	Virology

3) **Alihan A,** Sayıner A.A. Validation of a multiplex Qrt-pcr assay for the detection of RSV, Influenza virüs A/B and SARS-CoV-2. Diagnostic Microbiology and Infection Disease. Makale sisteme yüklenmiştir, değerlendirme aşamasındadır.

EK 5. SCIE dergiye yüklenmiş, değerlendirme aşamasında olan yayın

