

cobas® Faktör II ve Faktör V Testi

In vitro diagnostik kullanım için



cobas® Faktör II ve Faktör V Testi

96 Tests

P/N: 07948352190

İÇİNDEKİLER

Kullanım amacı

Testin özeti ve açıklaması

Temel bilgiler	4
Prosedürün ilkeleri	4
Örneğin hazırlanması.....	4
PCR yoluyla amplifikasyon	4

Malzemeler ve reaktifler

Sağlanan malzemeler ve reaktifler.....	6
Reaktif saklama ve kullanma	6
Diğer gerekli malzemeler	7
Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar	7

Önlemler ve taşıma gereklilikleri

Uyarılar ve önlemler	7
İyi laboratuvar uygulamaları	8
Kontaminasyon	8
Bütünlük	8
Atma.....	9
Dökülme ve temizleme.....	9

Örnek toplama, taşıma ve saklama

Numune toplama ve kullanma	9
Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi.....	9
İşlenmiş örneklerin saklanması ve stabilitesi	10

Test prosedürü

Testin uygulanması	10
--------------------------	----

Kullanım yönergeleri

Çalışma hacmi	11
DNA izolasyonu	11
Amplifikasyon ve tespit	11
Cihaz düzeneği	12
Reaksiyon düzeneği.....	13
Plakanın hazırlanması	14
PCR'nin başlatılması.....	14

Sonuçlar

Sonuçların yorumlanması	15
Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi.....	16

Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği.....	16
Sonuç işaretlerinin listesi	16
Prosedürle ilgili sınırlamalar	18
Klinik olmayan performans değerlendirmesi	
Analitik duyarlılık	19
DNA girdisi üst limiti	20
DNA izolasyonu tekrarlanabilirliği	20
Analitik özgüllük	21
Engelleyici maddeler	21
Tekrarlanabilirlik, lotlar arası	22
Klinik performans değerlendirmesi	
Yöntem korelasyonu: Sanger dizilemesiyle karşılaştırma	23
Tekrar üretilebilirlik	24
Ek bilgiler	
Semboller	26
Üretici ve distribütörler	27
Ticari markalar ve patentler	27
Telif Hakkı	27
Referanslar	28
Belge revizyonu.....	29

Kullanım amacı

cobas® Faktör II ve Faktör V Testi, trombofili şüphesi olan hastaların teşhis edilmesinde yardımcı olarak, K₂EDTA tam kan numunelerinden elde edilen genomik DNA'dan, insan Faktör II (Protrombin) G20210A mutasyonu ve insan Faktör V Leiden mutasyonunun saptanması ve genotiplemesi için gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (PCR) kullanan *in vitro* diagnostik bir cihazdır. Otomatik amplifikasyon ve saptama için **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testi ve **cobas z 480** analiz cihazı birlikte kullanılır.

Testin özeti ve açıklaması

Temel bilgiler

Trombofili, pıhtılaşma sisteminde kalıtsal veya edinsel bir defekt nedeniyle tromboz (yani kan pıhtıları) geliştirme yatkınlığı gösteren bir sağlık sorunudur. Kan pıhtıları, venöz veya arteriyel vasküler sistemde oluşabilir ve Derin Ven Trombozuna (DVT) veya Pulmoner Embolizme (PE) yol açabilir. DVT ve PE birlikte Venöz Tromboembolizm (VTE) olarak anılır.¹ VTE, akut koroner sendrom ve felçten sonra kalp ve damar rahatsızlıklarından kaynaklanan ölümlerin bilinen en yaygın üçüncü nedenidir.²

Kalıtsal trombofiliye en çok Faktör V veya Faktör II (Protrombin) gen mutasyonu neden olmaktadır. Faktör V Leiden mutasyonu, Faktör V proteinde 506 (R506Q) konumunda arjinin ile glutaminin yer değiştirmesine neden olan insan Faktör V geninin tek noktali bir mutasyonudur (1691 konumunda G'den A'ya veya G1691A). Faktör V Leiden mutasyonu, proteini, aktive edilmiş C proteini (APC) tarafından inaktive edilmeye kısmi olarak dirençli kılar. APC direnci, VTE ile ilişkilendirilen en yaygın pıhtılaşma abnormalitesi olarak düşünülür.^{3,4} Yapılan genetik analiz, genel popülasyonda görece yüksek bir yaygınlığa sahip olan (örn. Beyaz ırkta yaklaşık %5) Faktör V Leiden mutasyonunun, APC direnci vakalarının %85 ila %95'inden sorumlu olabileceğini göstermiştir.⁴ Faktör V G1691A mutasyonuna ek olarak, Faktör II G20210A (G ila A, 20210 pozisyonunda) mutasyonu için moleküler genetik testlerin yapılması önerilir çünkü bu mutasyon genel popülasyonun %1 ila 3'ünde görülür ve VTE ile ilişkisi iyi bilinmektedir.⁵⁻⁷ Bir Faktör II ve Faktör V genotipleme testiyle bir hastanın kalıtsal trombofili riskinin değerlendirilmesi, trombofili hastalarının teşhisi ve klinik olarak yönetilmesi açısından kritik önem taşır.

Prosedürün ilkeleri

cobas® Faktör II ve Faktör V Testinde, 20210 konumunda Faktör II geninin genotipini ve/veya 1691 konumunda Faktör V geninin genotipini belirlemek için K₂EDTA tam kan numunesinden alınan genomik DNA örnekleri gerçek zamanlı olarak PCR yoluyla analiz edilir. Test **cobas z 480** analiz cihazında gerçekleştirilir. Uygulamanın geçerliliğini doğrulamak için her aşamada bir pozitif kontrol (**F2F5 PC**) ve negatif kontrol (**F2F5 NC**) kullanılır.

Örneğin hazırlanması

Genomik DNA'nın K₂EDTA tam kan numunelerinden izole edilmesi, yeterli konsantrasyonda DNA sağlayacak DNA izolasyon yöntemleri kullanılarak ($\geq 0,1$ ng/ μ L) gerçekleştirilebilir.

PCR yoluyla amplifikasyon

Hedefin seçilmesi

cobas® Faktör II ve Faktör V Testi, sırayla Faktör II (protrombin) ve Faktör V Leiden mutasyonlarının merkezlerini içeren Faktör II geninin 173 baz çifti bölgesini veya Faktör V geninin 233 baz çifti bölgesini amplifiye eden iki adet PCR primer çifti ihtiva eder. Her iki gen için de hem yabancıl tip hem de mutant alleller amplifiye edilir.

07948344001-01TR

Doc. Rev. 1.0

Hedef amplifikasyon

Thermus cinsi Z05 DNA polimeraz ve PCR primerleri Faktör II ve Faktör V hedef bölgelerini amplifiye etmek için kullanılır. İlk olarak, PCR karışımı, genomik DNA'yı denatüre etmek ve primer hedef dizilerini açığa çıkarmak için ısıtılır. Karışım soğuduğu zaman, yukarı yönlü ve aşağı yönlü primerler, Faktör II ve Faktör V genlerindeki hedef DNA dizilerine bağlanır ve Z05 DNA polimerazı, divalan metal katyonu ve fazla dinükleotid trifosfatlar (dNTPs) olması halinde, hedef DNA'yı bir şablon olarak kullanarak her bir bağlanmış primeri uzatır. Bu durum PCR'nin birinci döngüsünü tamamlayarak Faktör II hedef bölgesinin ve Faktör V hedef bölgesinin çift iplikli DNA kopyalarını (amplikonlar) üretir. Bu işlem, belli sayıda döngü için tekrarlanır, hedef bölgeler için her döngüde Faktör II ve Faktör V DNA'nı miktarını etkili bir şekilde iki katına çıkarır.

Otomatik gerçek zamanlı genotipleme

cobas® Faktör II ve Faktör V Testinde, 20210 konumunda Faktör II geninin genotipini ve/veya 1691 konumunda Faktör V geninin genotipini belirlemek için gerçek zamanlı PCR teknolojisinden yararlanılır. Oluşan reaksiyon, Faktör II (G20210A mutasyonu ve yabancı tip diziler) için iki ve Faktör V (G1691A mutasyonu ve yabancı tip diziler) için iki olmak üzere dört oligonükleotid probu içerir. Her oligonükleotid probu, haberci işlevi görevi floresan bir boya ve yeni bir prob içerisindeki haberci boyadan gelen floresan emisyonları absorbe eden (söndüren) bir söndürücü molekül ile işaretlenir. Her bir amplifikasyon döngüsü esnasında, problemler amplikon DNA'nın tamamlayıcı bölgelerine bağlanır ve Z05 DNA Polimerazın 5' ile 3' nükleaz aktivitesiyle bölünür. Yabancı tip ve mutant problemleri sadece sırayla ilgili yabancı tip veya mutant Faktör II ve Faktör V dizilerine bağlandıkları zaman bölünür.

Prob moleküllerin bölünmesi haberci boyanın söndürücüden ayrılmasına izin verir böylece, reaksiyon ışığının doğru dalga boyu ile ışıdığı zaman haberci boyanın floresan ışınımı ölçülebilir. Faktör II ve Faktör V yabancı tip ve mutant problemler farklı haberci boyalarla işaretlenir. Gerçek zamanlı PCR analizi sırasında haberci boyalardan herhangi birisi için yükseltilmiş floresan ışımaya tespit edilmesi ilgili boyaya karşılık gelen Faktör II ve Faktör V allelinin reaksiyondaki varlığını gösterir. Faktör II ve Faktör V genotipleri her bir gen için hangi allellerin tespit edildiğine bağlı olarak belirlenir. Bir gen için hem mutant hem yabancı tip alleller tespit edildiye, genotip heterozigottur. Sadece yabancı tip veya mutant alleller tespit edilirse, bu durumda genotip sırayla yabancı tip veya homozigot mutanttır. Faktör II veya Faktör V için ne yabancı tip ne de mutant allel tespit edilmişse, her iki gen için de sonuç geçersizdir.

Selektif amplifikasyon

Numuneden gelen hedef nükleik asidin seçici bir şekilde amplifiye edilmesi **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testinde, AmpErase (urasil-N-glikosilaz enzimi) ve deoksiüridin trifosfat (dUTP) kullanılarak gerçekleştirilir.⁸ AmpErase enzimi, timidin içeren DNA ipliklerini değil deoksiüridin içeren DNA ipliklerini tanıır ve bunların yıkımını katalizler. Deoksiüridin doğal oluşumlu DNA'da yoktur ancak Master Mix reaktifinde dinükleotid trifosfatlardan birisi olarak deoksitimidin trifosfatın yerine dUTP kullanıldığı için amplikon DNA'da her zaman mevcuttur; bu nedenle sadece amplikon DNA deoksiüridin içerir. Deoksiüridin, kontamine edici amplikonu, hedef DNA'nın amplifiye edilmesi öncesinde AmpErase enzimiyle yıkılmaya maruz bırakır. Master Mix reaktifinde yer alan AmpErase enzimi, C1-konumunda deoksiriboz zincirini açarak deoksiüridin kalıntılarında deoksiüridin içeren DNA'nın bölünmesini katalizler. Alkalın pH'da birinci ısı çevrim aşamasında ısıtıldığında, amplikon DNA zinciri deoksiüridinin konumunda kırılır, böylece DNA'nın amplifiye edilemez olmasını sağlar. AmpErase enzimi, 55°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yani ısı çevrim aşamalarının tümünde inaktiftir ve böylece hedef amplikonu yıkmaz.

Malzemeler ve reaktifler

Sağlanan malzemeler ve reaktifler

Kit	Reaktifler ve İçindeki Malzemeler	Test Başına Kullanılan Miktar	Güvenlik Sembolü ve Uyarı ^a
cobas® Faktör II ve Faktör V Testi 96 Test (P/N: 07948352190)	F2F5 MMX (Faktör II ve Faktör V Master Mix) Termostabil DNA polimerazı, AmpErase (urasil-N-glikosilaz), oligonükleotid PCR primerleri, floresan ile işaretlenmiş oligonükleotid problemleri, deoksinükleotid trifosfatlar, gliserol, dimetil sülfoksit, iyonik olmayan deterjan ve %0,09 Sodyum azid	4 x 0,6 mL	Yok
	F2F5 COFACTOR (Faktör II ve Faktör V Kofaktör) Manganez asetat, magnezyum asetat, bovin serum albumin ve %0,09 Sodyum azid	4 x 0,15 mL	Yok - Tehlikeli bir madde veya karışım değildir. EUH210 Talep halinde güvenlik bilgi formu sağlanabilir.
	F2F5 PC (Faktör II ve Faktör V Pozitif Kontrol) %0,05 Sodyum azid içeren tamponlanmış bir çözeltide enfeksiyöz olmayan nükleik asitler	4 x 0,05 mL	Yok
	F2F5 NC (Faktör II ve Faktör V Negatif Kontrol) %0,05 Sodyum azid içeren tamponlanmış çözelti	4 x 0,4 mL	Yok

^aÜrün güvenlik etiketi öncelikli olarak AB GHS kılavuzlarına tabidir.

Reaktif saklama ve kullanma

Kit	Saklama Sıcaklığı	Saklama Süresi
cobas® Faktör II ve Faktör V Testi	2°C ila 8°C	Herhangi bir reaktif kiti açıldığı zaman, 90 gün içinde iki kullanıma kadar ya da son kullanma tarihine kadar (hangisi önce gelirse) stabildir.

Not: Reaktifleri dondurmayın.

Diğer gerekli malzemeler

Malzemeler	P/N
Çamaşır suyu	Herhangi bir satıcı
%70 Etanol	Herhangi bir satıcı
cobas® 4800 Sistemi Mikrokuyucuk Plakası (AD-Plakası) ve kapatıcı film	Roche 05232724001
cobas® 4800 Sistemi kapatıcı film aplikatörü (cobas® 4800 Sisteminin montajıyla sağlanır)	Roche 04900383001
Ayarlanabilen pipetleyiciler* (5 – 1000 µL pipetleme yapabilir)	Herhangi bir satıcı
Aerosol bariyer veya pozitif yer değiştirmeli DNase-içermeyen pipet uçları	Herhangi bir satıcı
Tezgah üstü mikrosantrifüj* (20.000 x g kapasiteli)	Eppendorf 5430 veya 5430R veya eşdeğer
Mikrosantrifüj tüpleri (1,5 mL RNase/DNase içermeyen/PCR sınıfı)	Life Technologies AM12400 veya Eppendorf 022364120 veya eşdeğer
Konik ve mikrosantrifüj tüp rakları	Herhangi bir satıcı
Vorteks karıştırıcı*	Herhangi bir satıcı
Tek kullanımlık pudrasız eldivenler	Herhangi bir satıcı

*Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

Ayrı satılan malzemelerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar

Gerekli Cihaz ve Yazılımlar, Sağlanmamıştır
cobas z 480 analiz cihazı
cobas® 4800 Sistem Kontrol Ünitesi ve Sistem Yazılımı sürümü 2.2 veya üstü
Faktör II ve Faktör V Analiz Paketi Yazılım versiyonu 1.0 veya üstü
Barkod Okuyucu uzat. USB
Yazıcı (ör. HP P2055d)

Ayrı satılan malzemelerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Önlemler ve taşıma gereklilikleri

Uyarılar ve önlemler

Herhangi bir test prosedüründe olduğu gibi, bu testin iyi performans sağlaması için iyi laboratuvar uygulamaları esastır.

- Sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir
- Güvenlik Bilgi Formları (SDS) talep halinde bölge Roche ofisinizden temin edilebilir.
- Tüm numuneler, Mikrobiyoloji ve Biyomedikal Laboratuvarlarında Biyo Güvenlik⁹ ve CLSI Dokümanı M29-A4'te¹⁰ tanımlanan iyi laboratuvar uygulamaları kullanılarak enfeksiyöz madde gibi değerlendirilmelidir.
- Steril tek kullanımlık pipetlerin ve DNase içermeyen pipet uçlarının kullanılması önerilir.

İyi laboratuvar uygulamaları

- Ağzınızla pipetleme yapmayın.
- Laboratuvar çalışma ortamlarında yiyecek veya içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin.
- Örneklerle ve kit reaktifleriyle işlem yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Reaktiflerle işlem yaparken gözlük, laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldiven kullanın. Bu malzemelerin cildinize, gözlerinize veya mukoza membranlarına temas etmesinden kaçının. Temas etmeniz durumunda, vakit kaybetmeden bol miktarda suyla yıkayın. Tedavi edilmezse yanıklar oluşabilir. Dökülme meydana gelirse, silmeden önce suyla seyreltin.
- Distile veya deiyonize suya %0,5 oranında sodyum hipoklorit ekleyerek taze hazırlayacağınız çözeltiyle laboratuvardaki tüm çalışma yüzeylerini iyice temizleyin ve dezenfekte edin (ev temizliği için kullanılan çamaşır suyunu 1:10 oranında seyreltin). Bunun ardından %70 etanol içeren çözeltiyle yüzeyi silin.

Not: *Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.*

Kontaminasyon

- Kontaminasyonu önlemek için eldiven kullanılmalıdır ve farklı numunelerle ve cobas® Faktör II ve Faktör V Test reaktifleriyle işlem yapıldıktan sonra eldiven değiştirilmelidir. Numunelerle işlem yaparken kontamine edici eldiven kullanmaktan kaçının.
- DNA izolasyon alanlarından ayrılmadan önce veya çözeltilerle veya bir numuneyle temas edildiğinden şüpheleniliyorsa eldivenler değiştirilmelidir.
- Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonundan kaçının.
- Amplifikasyon ve tespit çalışma alanı MMX hazırlama işlemine başlamadan önce tümüyle temizlenmelidir. Her aktiviteye ayrı malzemeler ve ekipmanlar hazırlanmalıdır ve bu malzemeler ve ekipmanlar diğer aktiviteler için kullanılmamalıdır veya alanlar arasında hareket ettirilmemelidir. Örneğin, DNA izolasyonu için kullanılan pipetleyiciler ve malzemeler Amplifikasyon ve Tespit işlemlerine yönelik reaktifleri hazırlamak için kullanılmamalıdır.
- Laboratuvardaki iş akışının tek yönlü olarak ilerlemesi, bir sonraki aktiviteye geçmeden önce hali hazırda aktivitenin tamamlanması önemle tavsiye edilir. Örneğin, amplifikasyon ve tespit işlemlerine geçmeden önce DNA izolasyonu tamamlanmalıdır. DNA izolasyonu, amplifikasyon ve tespit işlemleri için kullanılacak alandan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Çalışma master mix'inin DNA örnekleriyle kontamine edilmesini önlemek için çalışma master mix'inin hazırlanması öncesinde amplifikasyon ve tespit çalışma alanı tümüyle temizlenmelidir.

Bütünlük

- Kitleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Farklı kitlerden veya lotlardan alınan reaktifleri birlikte kullanmayın.
- Farklı kit lotlarından gelen reaktif şişelerini birleştirmeyin.
- Tek kullanımlık ürünleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Tek kullanımlık ürünlerin hepsi sadece bir kez kullanılmak içindir. Tekrar kullanmayın.
- Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

Atma

- **F2F5 MMX, F2F5 COFACTOR, F2F5 PC ve F2F5 NC** sodyum azid içerir. Sodyum azid, bakır ve kurşun su borularıyla reaksiyona girerek yüksek patlayıcı özelliğe sahip metal azidler oluşturabilir. Laboratuvardaki lavabolarda çözeltileri içeren sodyum azid atılırken, azid birikimini önlemek için bol miktarda soğuk su akıtarak giderleri temizleyin.
- Kullanılmayan reaktifleri ve atıkları ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere göre atın.

Dökülme ve temizleme

- Potansiyel olarak bulaşıcı olan ajanları içeren bir malzeme döküldüğü zaman, ilk önce etkilenen alanı laboratuvar deterjanı ve suyla ardından %0,5 sodyum hipoklorit ile temizleyin.
- Dökülme **cobas® 4800** cihazının üzerinde gerçekleşirse, temizlemek için **cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri**'nde yer alan yönergeleri izleyin.
- **cobas z 480** analiz cihazını temizlemek için sodyum hipoklorit çözeltisi (çamaşır suyu) kullanmayın. **cobas z 480** analiz cihazını **cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri**'nde tarif edilen prosedürlere göre temizleyin.
- **cobas z 480** analiz cihazının kontaminasyon riskini azaltmaya yönelik ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için, **cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri**'ne bakın.

Örnek toplama, taşıma ve saklama

Not: Tüm örnekleri bulaşıcı madde yayma potansiyeli olduğunu varsayarak kullanın.

Numune toplama ve kullanma

cobas® Faktör II ve Faktör V Testi, insandan alınan ve K₂EDTA ile antikoagüle edilmiş tam kan örneklerinden izole edilmiş genomik DNA üzerinde kullanılmak için geliştirilmiştir. Tam kan örneklerinden izole edilmiş DNA derhal test edilebilir veya kullanılan DNA izolasyon kitinde belirtilen önerilere göre saklanabilir.

Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi

K₂EDTA ile antikoagüle edilmiş tam kan örnekleri 2°C ila 30°C'de veya dondurulmuş halde taşınabilir (Tablo 1). **cobas® Faktör II ve Faktör V Testi** tam kan örneklerinde üç defaya kadar dondurulup çözdürüldüğünde aynı sonucu vermiştir. Tam kan örneklerinin taşınması, etiyolojik ajanların taşınmasıyla ilgili ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere uygun olmalıdır.¹¹

Tablo 1 Tam kan örneğinin stabilitesi

Tam Kan Örneği Saklama Sıcaklığı	15°C ila 30°C	2°C ila 8°C	-15°C ila -25°C
Saklama Süresi	3 güne kadar	7 güne kadar	6 haftaya kadar

İşlenmiş örneklerin saklanması ve stabilitesi

K₂EDTA ile antikoagüle edilmiş tam kan örneklerinden izole edilmiş DNA derhal test edilebilir veya DNA izolasyon kitinin üreticisinin önerilerine göre saklanabilir. İzole edilmiş DNA, önerilen saklama dönemleri içinde ya da DNA'yı ekstrakte etmek için kullanılan ticari DNA izolasyon kitinin son kullanma tarihinden önce (hangisi daha önce gelirse) kullanılmalıdır. Kurum içi testler, Tablo 2'de gösterildiği gibi genomik DNA stabilitesini destekler. Saklanan genomik DNA örnekleri kullanılmadan önce, örneği içeren tüpe puls vorteks uygulayın. **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testi, üç defaya kadar dondurulup çözündürüldüğünde genomik DNA örneklerinde aynı sonuçları vermiştir.

Tablo 2 Genomik DNA'nın Stabilitesi

Ekstrakte Edilmiş DNA Saklama Sıcaklığı	2°C ila 8°C*	-15°C ila -25°C*
Saklama Süresi	7 güne kadar	6 haftaya kadar

*Piyasadan temin edilebilen üç DNA izolasyon yöntemi kullanılarak oluşturulmuş veriler

Test prosedürü

Testin uygulanması

Tablo 3 cobas® Faktör II ve Faktör V Testi iş akışı

1	DNA tam kan örneklerinden izole edilmemişse, DNA izolasyonu gerçekleştirin
2	DNA örneklerini ve test reaktiflerini depodan çıkarın
3	cobas® 4800 Sistemini başlatın
4	Cihaz bakımını gerçekleştirin
5	İş düzeni oluşturun ve plaka yerleşim planının çıktısını alın
6	Amplifikasyon reaktiflerini hazırlayın
7	Mikrokuyucuk plakasına amplifikasyon reaktiflerini yerleştirin
8	Mikrokuyucuk plakasına örnekleri ve kontrolleri yerleştirin
9	Mikrokuyucuk plakasını kapatın
10	Mikrokuyucuk plakasını cobas z 480 analiz cihazının üzerine yerleştirin
11	Çalışmayı başlatın
12	Sonuçları gözden geçirin
13	LIS ile: sonuçları LIS'e gönderin
14	Analiz cihazını boşaltın

Kullanım yönergeleri

Not: *cobas z 480 analiz cihazının ayrıntılı çalıştırma yönergeleri için cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri'ne bakın.*

Çalışma hacmi

Tek bir çalışma döngüsü, 96 kuyucuklu Mikrokuyucuk plakası başına bir ila 94 örnek ve iki kontrol içerir. **cobas®** Faktör II ve Faktör V Test kiti, kit başına sekiz test partisine kadar 96 örneğin test edilmesi için yeterli reaktif içerir.

DNA izolasyonu

1. Genomik DNA'yı, şeffaf ve renksiz ve yeterli konsantrasyona sahip ($\geq 0,1$ ng/ μ L) genomik DNA örnekleri üretebilen bir DNA izolasyon yönteminden yararlanarak K₂EDTA ile antikoagüle edilmiş ve insandan alınan tam kan örneğinden izole edin.
2. **F2F5 NC**, DNA izolasyonu sırasında kontaminasyon için bir kontrol olarak DNA izolasyon prosedürüne eklenebilir veya **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testinde işleme alınmadan doğrudan kullanılabilir.
3. **F2F5 PC** DNA izolasyonu olmadan **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testinde kullanılabilir. **F2F5 PC** üzerinde DNA izolasyonu gerçekleştirmeyin.
4. İzole edilen genomik DNA **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testiyle hemen test edilebilir veya DNA izolasyon kiti üreticisinin önerilerine göre saklanabilir.

Amplifikasyon ve tespit

Not: *Çalışma MMX'inin DNA örnekleriyle kontamine edilmesini önlemek için, amplifikasyon ve tespit işlemleri DNA izolasyonundan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Amplifikasyon ve tespit çalışma alanı çalışma MMX hazırlığından önce tümüyle temizlenmelidir. Doğru temizlik için, raklar ve pipetleyiciler dahil tüm yüzeyler önce %0,5 sodyum hipoklorit çözeltisiyle ardından %70 etanol çözeltisiyle tümüyle silinmelidir. Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.*

İş düzeni ve plaka yerleşim planı

Bu iş akışı aşamalarıyla ilgili ayrıntılı yönergeler için **cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri**'ne bakın.

Çalışmadaki tüm örnek ve kontrollerin konumlarını içeren bir iş düzeni ve yerleşim planı oluşturun. Plaka üzerinde **F2F5 PC**, A01 konumuna ve **F2F5 NC**, B01 konumuna yerleştirilir. Daha sonra genomik DNA örnekleri Tablo 4'te gösterildiği gibi C01'den H01'e, C02'den H02'ye biçiminde eklenir.

Tablo 4 cobas® Faktör II ve Faktör V Testi için yerleşim planı

Satır / Sütun	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	PC ^a	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
B	NC ^b	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
C	S1 ^c	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
D	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
E	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
F	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92
G	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S93
H	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S94

^a PC = **F2F5 PC**

^b NC = **F2F5 NC**

^c S = Örnek

Cihaz düzeneği

1. **cobas z 480** analiz cihazını açın. Çalışma başlamadan önce cihaz birkaç dakika ısınır.
2. Kontrol ünitesini açın. Kontrol ünitesi otomatik olarak Windows oturumunu başlatır.
3. **cobas® 4800** yazılım simgesine çift tıklayın ve çalışmayı başlatmak için belirtilen lab kullanıcı adını ve parolasını kullanarak oturum açın.
4. Menü üzerinde yer alan “New Run” simgesine tıklayın.
5. “Select Test” penceresi açılır. “PCR Only” İş Akışı tipini seçin ve ardından “F2F5” ögesini seçin ve “OK” düğmesine tıklayın.
6. “Work Place” Ekranı görüldüğünde, “Microwell Plate ID” alanına tıklayın ve Mikrokuyucuk Plaka (MWP) Barkodunu girin veya taratın. İsterseniz “Comments” alanına yorumlarınızı girin.
7. Birinci kit barkodu satırında “F2F5 Test Kit-ID” alanına tıklayın ve **cobas®** Faktör II ve Faktör V Test kiti ID barkodunu girin veya taratın. Aynı satırdaki “Specimen” alanında, çalışmada test edilecek örneklerin sayısını girin.
 - a. Tek bir kit lotu kullanılırsa, 94'e kadar örnek birinci kit barkod satırına girilebilir (**F2F5 PC** ve **F2F5 NC** için 2 sonuç ayrılır).
 - b. Aynı lottan alınan birden çok kit kullanılırsa (4 kite kadar), “F2F5 Test Kit-ID” alanına **cobas®** Faktör II ve Faktör V Test kiti ID barkodunu ve “Specimen” alanına, her bir kit için bir kit barkodu satırını kullanarak ilgili kit ile test edilecek örnek sayısını girin.
 - c. AD plakası başına maksimum 94 örnek ve 2 kontrol çalışılabilir.

8. "Sample ID" kontrol konumları (A01 ve B01) için otomatik olarak doldurulur. Her örnek için Sample ID sütununa "Sample ID" bilgisini girin veya taratın. Aynı çalışmadaki her Örnek Kimliği benzersiz olmalıdır. "Kit" ve "Sample Type" alanları otomatik olarak doldurulur.
9. Her örnek için, "Requested Result" ögesini seçin: Sadece Faktör II için "F2", Sadece Faktör V için "F5" veya hem Faktör II hem de Faktör V için "F2F5".
10. İsterseniz her bir örnek için yorumlarınızı girebilirsiniz.
11. Tüm bilgiler girildiği zaman, ekranın sağ alt köşesinde yer alan "Save" düğmesine tıklayın.
12. Dosyayı yazılım tarafından belirlenmiş olan varsayılan dosya adıyla kaydedin.
13. Print düğmesine tıkladıktan sonra Preview penceresinde File -> Print ögesini seçerek çalışma kapsamındaki tüm örneklerin ve kontrollerin konumlarının yer aldığı plaka yerleşim planını yazdırın. Plakayı A01 konumunda **F2F5 PC** ve B01 konumunda **F2F5 NC** ile başlayarak sütunlara göre doldurun. C01 konumuyla başlayarak ve aşağıya doğru H01 ile devam ederek örnekleri eşleyin, ardından tüm örnekler eşlenene kadar A02'den H02'ye, A03'ten H03'e şeklinde devam edin.

Reaksiyon düzeneği

Çalışma master mix'inin hazırlanması

Not: **F2F5 MMX** ve **çalışma MMX (MMX ve COFACTOR)** ışığa karşı duyarlıdır ve uzun süreli ışığa maruz kalmaktan korunmalıdır. Çalışma MMX'i 2°C ila 8°C'de karanlık bir yerde muhafaza edilmelidir.

Not: İzole edilen DNA örnekleri ve kontrolleri, çalışma MMX'i hazırlandıktan sonra 1 saat içinde eklenmelidir. İşlenen örnekler ve kontroller çalışma MMX'ine eklendikten sonra 1 saat içinde amplifikasyon başlatılmalıdır.

Not: **F2F5 MMX** açık mavi/mor renkte görünebilir. Bu durum reaktifin performansını etkilemez.

1. Aşağıdaki formülü kullanarak gerekli **F2F5 MMX** hacmini hesaplayın:
Gerekli **F2F5 MMX** hacmi = (Örnek Sayısı + 2 Kontrol + 1) x 20 µL
2. Aşağıdaki formülü kullanarak gerekli **F2F5 COFACTOR** hacmini hesaplayın:
Gerekli **F2F5 COFACTOR** hacmi = (Örnek Sayısı + 2 Kontrol + 1) x 5 µL

Tablo 5 çalışmaya dahil edilen örnek sayısına dayalı olarak çalışma MMX'inin hazırlanması için ihtiyaç duyulan **F2F5 MMX** ve **F2F5 COFACTOR** hacmini belirlemek için kullanılabilir.

Tablo 5 Çalışma MMX'i için reaktif hacimleri

		Örnek Sayısı ^a						
		1	2	3	6	9	12	24
MMX	20 µL	80	100	120	180	240	300	540
COFACTOR	5 µL	20	25	30	45	60	75	135
Çalışma MMX'i Toplam Hacmi (µL)		100	125	150	225	300	375	675

^a Test edilecek örnek sayısına bağlı MMX ve COFACTOR hacimleri + 2 kontrol + 1 ekstra reaksiyon.

3. Uygun sayıda 2°C ila 8°C'de muhafaza edilen **F2F5 MMX** ve **F2F5 COFACTOR** şişesini alın. Her reaktifi 5 saniye vorteksleyin ve kullanmadan önce tüpün altındaki sıvıyı toplayın.

4. 24 örneğe kadar her bir setin çalışma MMX'i için steril bir mikrosantrifüj tüpü etiketleyin.
5. Hesaplanan **F2F5 MMX** hacmini etiketlenen tüpe ekleyin.
6. Hesaplanan **F2F5 COFACTOR** hacmini etiketlenen tüpe ekleyin.
7. Yeterli karışımı sağlamak için MMX tüpünü 3 ila 5 saniye vorteksleyin.

Not: Örnekler ve kontroller, çalışma MMX'i hazırlandıktan sonra 1 saat içinde mikrokuyucuk plakasına (AD-plakası) eklenmelidir.

Not: Sadece cobas® 4800 Sistemi Mikrokuyucuk Plakası (AD-Plakası) ve Kapatıcı film kullanın.

Plakanın hazırlanması

Not: Muhafaza edilmiş genomik DNA örnekleri kullanacaksanız, İşlenmiş örneklerin saklanması ve stabilitesi bölümünde yer alan yönergeleri izleyin.

1. Daha önce hazırlanmış olan plaka haritasına göre çalışmada kullanılmak üzere mikrokuyucuk plakasının (AD-plakası) her reaksiyon kuyucuğuna 25 µL çalışma **MMX**'i pipetleyin. Pipet ucunun kuyucuğun dışındaki plakaya temas etmesine izin vermeyin.
2. 25 µL **F2F5 PC**'yi mikrokuyucuk plakasının (AD-plakası) **A01** kuyucuğuna pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.
3. Yeni bir pipet ucu kullanarak, 25 µL **F2F5 NC**'yi mikrokuyucuk plakasının (AD-plakası) **B01** kuyucuğuna pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.

Not: Her çalışma A01 kuyucuğunda F2F5 PC ve B01 kuyucuğunda F2F5 NC içermelidir aksi halde çalışma cobas z 480 analiz cihazı tarafından geçersiz kılınacaktır.

Not: Örnekten örneğe geçebilecek kontaminasyona veya PCR reaksiyon tüpü kontaminasyonuna karşı koruma sağlamak için gerektiği biçimde eldivenlerinizi değiştirin.

4. Her bir örnek için yeni bir pipet ucu kullanarak, her DNA örneğinden aldığınız 25 µL miktarı yukarıda hazırlanmış olan plaka yerleşim planına göre C01 konumundan başlayarak mikrokuyucuk plakasının (AD-plakası) uygun kuyucuğuna ekleyin. En az iki kez aspirasyon yöntemiyle çekmek ve kuyucuğun içine aktarmak için pipetleyiciyi kullanarak her kuyucuğu karıştırın. Tüm sıvının kuyucukların tabanında toplandığından emin olun.

Not: Muhafaza edilmiş olan genomik DNA örneklerine kullanmadan önce puls vorteks uygulayın.

5. Mikrokuyucuk plakasını (AD-plakası) kapatıcı film (plakalarla birlikte verilen) ile örtün. Filmi mikrokuyucuk plakasına (AD-plaka) sağlam bir şekilde yapıştırmak için kapatıcı film aplikatörünü kullanın.
6. PCR'yi başlatmadan önce tüm sıvının her kuyucuğun tabanında toplandığını onaylayın.

Not: İşlenen örnekler ve kontroller çalışma MMX'ine eklendikten sonra 1 saat içinde amplifikasyon başlatılmalıdır.

PCR'nin başlatılması

İş akışı aşamalarında belirtilen ayrıntılı yönergeler için **cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri**'ne bakın.

Sonuçlar

Sonuçların yorumlanması

Not: Tüm çalışma ve örnek doğrulama işlemleri cobas® 4800 yazılımıyla gerçekleştirilir.

Not: Geçerli bir test çalışması hem geçerli hem de geçersiz örnek sonuçlarını içerebilir.

Geçerli bir çalışma için, örnek sonuçları Tablo 6'da gösterildiği gibi yorumlanır.

Tablo 6 cobas® Faktör II ve Faktör V Testi için sonucun yorumlanması

Test sonucu	Yorum
WT F2	Genomik DNA örneği, Faktör II (protrombin) mutasyonu için yabancıl tiptir. Faktör II geninin 20210 konumundaki nükleotid her iki allel üzerinde G'dir.
HET F2	Genomik DNA örneği, Faktör II (protrombin) mutasyonu için heterozigottur. Faktör II geninin 20210 konumundaki nükleotid bir allel üzerinde G'dir diğer allel üzerinde A'dır.
MUT F2	Genomik DNA örneği, Faktör II (protrombin) mutasyonu için homozigot mutanttır. Faktör II geninin 20210 konumundaki nükleotid her iki allel üzerinde A'dır.
WT F5	Genomik DNA örneği, Faktör V (Leiden) mutasyonu için yabancıl tiptir. Faktör V geninin 1691 konumundaki nükleotid her iki allel üzerinde G'dir.
HET F5	Genomik DNA örneği, Faktör V (Leiden) mutasyonu için heterozigottur. Faktör V geninin 1691 konumundaki nükleotid bir allel üzerinde G'dir, diğer allel üzerinde A'dır.
MUT F5	Genomik DNA örneği, Faktör V (Leiden) mutasyonu için homozigot mutanttır. Faktör V geninin 1691 konumundaki nükleotid her iki allel üzerinde A'dır.
Geçersiz	Örnek sonucu geçersizdir. Aşağıdaki "Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi" adlı bölümde yer alan yönergeleri izleyerek geçersiz sonuç içeren örnekleri yeniden test edin.
Başarısız	Donanım veya yazılım hatası nedeniyle çalışma başarısız oldu. Teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi

1. Çalışma geçersiz ise, genomik DNA ile başlayarak tüm örnekler için bütün test prosedürünü tekrarlayın.
2. Çalışma geçerli ancak bazı örneklerin sonuçları geçersiz ise, genomik DNA ile başlayarak geçersiz örnekler için testi tekrarlayın. Tekrar edilen test halen geçersiz ise, genomik DNA örneklerinin tam kan örneğinden (örneklerinden) izolasyon işlemini tekrarlayın.

Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği

Her bir çalışmaya bir set **cobas®** Faktör II ve Faktör V kontrolü (**F2F5 PC** ve **F2F5 NC**) dahil edilir. Hem **F2F5 PC** hem de **F2F5 NC** geçerli ise çalışma geçerlidir. **F2F5 PC** veya **F2F5 NC** geçersiz ise, tüm çalışma geçersizdir ve tekrar edilmelidir. **F2F5 PC** veya **F2F5 NC** tutarlı bir geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Sonuç işaretlerinin listesi

Sonuç işaretleri Results sekmesinin altında görülebilir. Bir işaretin kaynağı, aşağıda Tablo 7'de belirtildiği şekilde işaret kodunda gösterilir. Tablo 8 kullanıcıyla ilgili tüm sonuç yorumlama işaretlerini listeler.

Tablo 7 İşaret kaynağı

İşaret kodu başlangıcı	İşaret kaynağı	Örnek
M*	Birden çok veya diğer nedenler	M6
R	Sonucun yorumlanması	R20
Z*	Analiz cihazı	Z1

* **cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri'**ne bakın.

Tablo 8 Sonuç yorumlama işaretlerinin listesi

İşaret kodu	Önem derecesi	Açıklama	Önerilen işlem
R2900, R2904, R2908, R2912	Hata	Pozitif Kontrol Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları dirsek belirleme algoritmasının atipik veya parazitli floresan paterni olması durumunda meydana gelebilecek bir hatayla karşılaştığını gösterir.
R2901, R2905, R2909, R2913	Hata	Pozitif Kontrol Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları Pozitif Kontrol için en az bir kanalda negatif bir sonuç oluştuğunu gösterir.
R2902, R2906, R2910, R2914	Hata	Pozitif Kontrol Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları Pozitif Kontrol için gözlemlenen bir Ct değerinin, yerleşik eşiğin üzerinde olduğunu gösterir (yani dirsek çok yüksektir). Olası nedenler şunlar olabilir: 1. Çalışma Master Mix'inin yanlış hazırlanması 2. Çalışma Master Mix'ini mikrokuyucu plakasının bir kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası 3. Pozitif Kontrolü mikrokuyucu plakasının bir kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası.
R2903, R2907, R2911, R2915	Hata	Pozitif Kontrol Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları Pozitif Kontrol için gözlemlenen bir Ct değerinin, yerleşik eşiğin altında olduğunu gösterir (yani dirsek çok düşük). Bu hata DNA kontaminasyonu durumunda oluşabilir.
R2916	Hata	Pozitif Kontrol Tespit Edilemedi	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodu tüm kanallarda Pozitif Kontrol için negatif bir sonuç oluştuğunu gösterir. Pozitif Kontrol DNA'sı kontrol kuyucuğuna eklenmemiş olabilir.
R2917, R2919, R2921, R2923	Hata	Negatif Kontrol Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları dirsek belirleme algoritmasının atipik veya parazitli floresan paterni olması durumunda meydana gelebilecek bir hatayla karşılaştığını gösterir.
R2918, R2920, R2922, R2924	Hata	Negatif Kontrol Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları, Negatif Kontrol için pozitif bir sonuç oluştuğunu gösterir (yani bir kontaminasyon gerçekleşmiştir).
R2925, R2928, R2931, R2934, R2940, R2941, R2942, R2943	Hata	Sonuç Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları dirsek belirleme algoritmasının atipik veya parazitli floresan paterni olması durumunda meydana gelebilecek bir hatayla karşılaştığını gösterir.
R2926, R2929, R2932, R2935	Hata	Sonuç Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları, örnekte atipik yüksek bir Ct değerinin gözlemlendiğini gösterir.
R2927, R2930, R2933, R2936	Hata	Sonuç Geçersiz	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları, örnekte atipik düşük bir Ct değerinin gözlemlendiğini gösterir.
R2937, R2938	Hata	Sonuç Geçersiz	Örneği tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları genlerden birisinin sonuçlarının (yani Faktör II veya Faktör V) geçerli olmadığını gösterir. Her iki gen için de geçerli bir sonucun olmaması, her genin diğeri için gösterdiği Dahili Kontrol işlevini ortadan kaldırır ve şunu ifade eder: 1. Örnekte alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür 2. İşleme alınan örnek miktarı yetersizdir 3. Örnek içinde PCR inhibitörleri vardır 4. Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar primerlerle ve/veya problemlerle kapatılmıştır 5. Örnek DNA bir ya da daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir 6. Diğer faktörler.
R2939	Hata	Hedefler Tespit Edilemedi	Çalışmayı tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodu tüm kanallarda örnek için negatif bir sonuç oluştuğunu gösterir. Genomik DNA kuyucuğa eklenmemiş olabilir.
R2944, R2945	Hata	Sonuç Geçersiz	Örneği tekrarlayın. Kullanım için teste özel yönergelerle bakın. Bu işaret kodları, örnek için belirli veri analizi parametreleri arasında atipik bir ilişkinin gözlemlendiğini gösterir.

Prosedürle ilgili sınırlamalar

1. Sonuçların geçerli olması örnekte var olan genomik DNA'nın miktarına bağlıdır ve örneğin bütünlüğünden, izole edilen DNA konsantrasyonundan ve etkileşen maddelerin varlığından etkilenebilir.
2. Kullanılan DNA izolasyon yöntemleri, şeffaf, renksiz ve konsantrasyon değeri $\geq 0,1$ ng/ μ L olan genomik DNA üretebilmelidir.
3. Hemoglobin, PCR inhibitörüdür. Tam kan örneğinden elde edilen genomik DNA'nın görünümü şeffaf ve renksiz olmalıdır. Kırmızı, pembe veya pas görünümlü renk tonlarına sahip veya şeffaf ve renksiz dışında herhangi bir görünüme sahip örnekler geçersiz veya yanlış sonuçlar üretebilir ve bu tip örnekler test edilmemelidir.
4. Alınan sonuçların güvenilir olması gerekli ve yeterli taşıma, depolama ve işleme alma koşullarına bağlıdır. Bu Kullanım Yönergelerinde ve **cobas® 4800 Sistemi - Kullanım Bilgileri**'nde yer alan prosedürleri izleyin.
5. AmpErase enziminin **cobas®** Faktör II ve Faktör V Test Master Mix'ine eklenmesi hedefe DNA'nın seçici bir şekilde amplifiye edilmesini sağlar; ancak, reaktiflerin kontamine edilmesini önlemek için iyi laboratuvar uygulamalarının izlenmesi ve bu Kullanım Yönergelerinde belirtilen prosedürlere sıkı sıkıya uyulması gereklidir.
6. Bu ürünü sadece PCR tekniklerinde ve **cobas®** 4800 Sisteminin kullanımında eğitimli olan personel kullanmalıdır.
7. Sadece **cobas z 480** analiz cihazının bu ürünle kullanılması onaylanmıştır. Başka gerçek zamanlı optik tespit sistemi olan hiçbir ısıl döngü cihazı bu ürünle kullanılamaz.
8. Teknolojiler arasındaki içsel farklılıklardan ötürü, bir teknolojiden diğer teknolojiye geçmeden önce kullanıcıların, teknoloji farklılıklarını değerlendirmek için kendi laboratuvarlarında yöntem korelasyon çalışmaları yapmaları önerilir.
9. Nadir vakalarda, **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testinde kullanılan primerler veya probalar tarafından kapatılan Faktör II geni ve Faktör V geninin genomik DNA bölgeleri içindeki mutasyonlar Faktör II G20210A mutasyonu veya Faktör V G1691A mutasyonunun varlığını tespit etmekte başarısız olabilir.
10. PCR inhibitörlerinin varlığı sonuçların geçersiz veya yanlış olmasına yol açabilir.
11. Ticari DNA izolasyon kitleri sıklıkla liziz reaktifinde guanidin hidroklorür gibi kaotropik tuzlar ve yıkama tamponunda etanol gibi maddeler içerir. Genomik DNA örneklerinde kaotropik tuzlar veya etanol maddesi sonuçların geçersiz veya yanlış olmasına neden olabilir. DNA izolasyon yöntemlerinde, liziz reaktiflerinin ve yıkama tamponlarının DNA izolasyon işlemi sırasında doğru bir şekilde çıkarılmasını sağlamak için üreticinin yönergelerini izleyin.

Klinik olmayan performans değerlendirmesi

Aşağıdaki veriler cobas® Faktör II ve Faktör V Testinin analitik performansını göstermek için hazırlanmıştır.

Analitik duyarlılık

Doğru Faktör II ve Faktör V genotip sonuçlarının alınması için gerekli minimum genomik DNA girdisini hesaplamak amacıyla, tam kan örnekleri için üç farklı ticari DNA izolasyon yöntemi ve hücre hattı için bir yöntem kullanılarak, K₂EDTA tam kan örneklerinden (Faktör II heterozigot, Faktör V heterozigot, Faktör V homozigot mutant) ve bir hücre hattından (Faktör II homozigot mutant) genomik DNA izole edilmiştir. Her genomik DNA örneği 10 farklı konsantrasyonda cobas® Faktör II ve Faktör V Testiyle test edilmiştir: biri seyreltilmemiş (6 ile 38 ng/μL arasında değişen) ve dokuzu ise 1,0 ile 0,0001 ng/μL arasında seri olarak seyreltilmiştir. Her seyrelti, iki kit lotunun her biriyle 24 tekrarlar yani her genomik DNA örneği için konsantrasyon başına toplam 48 tekrar ile test edilmiştir. Seyreltilmemiş genomik DNA örnekleri her bir kit lotuyla altı tekrar yapılacak şekilde yani genomik DNA örneği başına toplam 12 tekrar ile test edilmiştir.

Dört örneğin tümünde, üç DNA izolasyon yönteminin tümünde ve her iki kit lotunda doğru Faktör II ve Faktör V genotip sonuçları 0,01 ng/μL miktarda %98 ve daha yüksek tüm konsantrasyonlarda %100 çıkmıştır (Tablo 9). cobas® Faktör II ve Faktör V Testi, girdi DNA konsantrasyonu çok düşük olursa Geçersiz sonuçlar üretecek şekilde tasarlanmıştır. Yapılan çalışmada hiçbir yanlış genotip sonucu çıkmamıştır. Tespit limiti 0,01 ng/μL olup bu değer en düşük önerilen DNA girdi konsantrasyonundan 10 kat daha düşüktür.

Tablo 9 cobas® Faktör II ve Faktör V Testinin analitik duyarlılığı

Konsantrasyon (ng/μL)	Sayı	cobas® Faktör II ve Faktör V Testi Sonuçları		
		Doğru Sayı (%)	Yanlış Sayı (%)	Geçersiz Sayı (%)
Seyreltilmemiş*	120	120 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
1	480	480 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
0,3	480	480 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
0,1	480	480 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
0,03	480	480 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
0,01	480	473 (%98)	0 (%0)	7 (%2)
0,003	480	86 (%18)	0 (%0)	394 (%82)
0,001	480	0 (%0)	0 (%0)	480 (%100)
0,0003	480	0 (%0)	0 (%0)	480 (%100)
0,0001	480	0 (%0)	0 (%0)	480 (%100)
0	480	0 (%0)	0 (%0)	480 (%100)

*6 ila 38 ng/μL

DNA girdisi üst limiti

cobas® Faktör II ve Faktör V Testi için daha yüksek DNA girdi konsantrasyonlarını değerlendirmek amacıyla, genomik DNA, piyasadan temin edilebilen üç farklı DNA izolasyon yöntemi kullanılarak dört K₂EDTA tam kan örneğinden izole edilmiştir ve 300 ng/μL, 150 ng/μL ve 75 ng/μL oranlarında toplam DNA konsantrasyonları elde etmek için hücre hatlarından alınan konsantre genomik DNA eklenmiştir. Faktör II heterozigot, Faktör V heterozigot ve Faktör V homozigot mutant hücre hatlarından alınan genomik DNA, aynı Faktör II ve Faktör V genotiplerinin tam kan örneklerinden alınan genomik DNA'lara eklenmiştir. Faktör II homozigot mutant hücre hattı DNA, lökosit azaltılmış tam kan (LDWB) örneğinden alınan genomik DNA'ya eklenmiştir. 300 ng/μL, 150 ng/μL ve 75 ng/μL konsantrasyonlarındaki genomik DNA örnekleri iki kit lotunun her birinde 24 tekrarla, yani her genomik DNA örneği için toplam 48 tekrar ile test edilmiştir. Eklenmiş hücre hattı DNA'sı olmadan tam kan örneklerinden elde edilen genomik DNA örnekleri iki kit lotunun her birinde altı tekrarla, yani her genomik DNA örneği için toplam 12 tekrar ile test edilmiştir. 300 ng/μL, 150 ng/μL ve 75 ng/μL konsantrasyonundaki tüm örnekler, tüm testlerde doğru Faktör II ve Faktör V genotip sonuçları üretmiştir (Tablo 10). Eklenmiş hücre hattı DNA'sı olmayan LDWB örnekleri beklediği şekilde Geçersiz sonuçlar üretmiştir; tam kan örneklerinden alınan diğer genomik DNA örnekleri doğru Faktör II ve Faktör V sonuçları üretmiştir. En yüksek önerilen DNA girdi konsantrasyonu, test edilen maksimum girdinin yarısına karşılık gelen 150 ng/μL'dir.

Tablo 10 cobas® Faktör II ve Faktör V Testi için daha yüksek DNA girdisinin test edilmesi

Konsantrasyon (ng/μL)	Sayı	cobas® Faktör II ve Faktör V Testi Sonuçları		
		Doğru Sayı (%)	Yanlış Sayı (%)	Geçersiz Sayı (%)
300	576	576 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
150	576	576 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
75	576	576 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
Eklenmiş hücre hattı DNA'sı olmadan ^a	144	144 ^b (%100)	0 (%0)	0 (%0)

^a 6 ila 38 ng/μL

^b Lökosit azaltılmış tam kan örneklerinden alınan genomik DNA beklediği gibi Geçersiz sonuçlar üretmiştir. Bu sonuçlar bu tablo içinde "Geçersiz" ifadesinden ziyade "Doğru" olarak sınıflandırılır.

DNA izolasyonu tekrarlanabilirliği

Genomik DNA, her DNA izolasyon yöntemiyle örnek başına toplam altı DNA izolasyonu için piyasadan temin edilebilen üç DNA izolasyon yöntemi kullanılarak, üç günde iki operatöre tarafından, üreticinin yönergelerine göre on beş tam kan örneğinden izole edilmiştir. Her izole edilen genomik DNA örneği **cobas® Faktör II ve Faktör V Testiyle** (Tablo 11) üç kez tekrar edilerek test edilmiştir. **cobas® Faktör II ve Faktör V Testi** sonuçlarının yüzde yüzü, iki yönlü Sanger DNA dizilemesiyle gerçekleştirilen Faktör II ve Faktör V genotipleriyle uyumlu çıkmıştır. A yöntemiyle izole edilen bir genomik DNA örneği sonuçlardan hariç tutulmuştur. Bu örnek pas rengindedir ve üç testin tümünde de geçersiz sonuçlar üretmiştir. İzole edilen DNA örnekleri şeffaf ve renksiz görünmelidir. Şeffaf ve renksiz dışında başka görünümlere sahip DNA örnekleri geçersiz veya yanlış sonuçlar verebileceği için test edilmemelidir.

Tablo 11 DNA izolasyonu tekrarlanabilirliği

DNA İzolasyon Yöntemi	Toplam Sayı /		Sayı (%) /			
	DNA İzolasyonları	Testler	Doğru Sonuçlar		Yanlış Sonuçlar	Geçersiz Sonuçlar
A	89 ^a	267 ^a	267 ^a (%100,0)	[98,6 – 100] ^b	0 (%0,0)	0 (%0,0)
B	90	270	270(%100,0)	[98,6 – 100]	0 (%0,0)	0 (%0,0)
C	90	270	270(%100,0)	[98,6 – 100]	0 (%0,0)	0 (%0,0)
Toplam	269	807	807(%100,0)	[99,5 – 100]	0 (%0,0)	0 (%0,0)

^a A yöntemiyle izole edilen 90 DNA örneğinden birisi pas renginde olduğundan test dışı tutulmuştur. Sadece şeffaf ve renksiz olan DNA örnekleri test edilmelidir. Şeffaf ve renksiz dışında başka görünümlere sahip DNA örnekleri geçersiz veya yanlış sonuçlar verebileceği için test edilmemelidir.

^b %95 2 taraflı, alt güven sınırı

Analitik özgülük

Faktör V Leiden mutasyonuna (G1691A) ve Faktör II (protrombin) mutasyonuna (G20210A) yakın olan bilinen tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP'ler) etkisini belirlemek için, **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testinin prob bağlanma bölgelerinde yer alan sekiz bilinen SNP'yi (A20207C, C20209T, A20218G, C20221T, G1689A, C1690T, A1692C ve A1696G) içeren plazmid DNA'lar test edilmiştir. Faktör II SNP plazmidler ve Faktör V SNP plazmidler sırayla 20210 ve 1691 konumlarında yer alan yabancı tiptir. Her SNP plazmid DNA tek başına ve yabancı tip Faktör II plazmid DNA, yabancı tip Faktör plazmid DNA, yabancı tip Faktör II ve yabancı tip Faktör V plazmid DNA'larla ve yabancı tip tam kan örneğinden alınan genomik DNA ile test edilmiştir.

SNP plazmidlerinin hiçbirisi Faktör II (protrombin) ve Faktör V Leiden mutasyonları için yanlış pozitif sonuç vermemiştir. Dört adet Faktör II SNP plazmidlerinin tümü ve dört Faktör V SNP plazmidlerinin üçü sırayla yabancı tip Faktör II ve Faktör V DNA olarak tespit edilmiştir. Bir Faktör V SNP plazmid (G1689A) **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testi ile tespit edilmemiştir. Bu SNP her iki allelde varsa, test sonucu geçersiz olacaktır.

Engelleyici maddeler

Trigliseritler (37 mM), bilirubin (konjuge ve konjuge olmayan, 342 µM) ve kolesterol (13 mM), CLSI tarafından önerilen konsantrasyonlarda tam kan örneklerine eklendiğinde **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testini engellememiştir.¹² Hemoglobin, 20 g/L oranında bir konsantrasyon ile tam kan örneğine eklendiğinde **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testini engellememiştir. Antikoagülan K₂EDTA maddesi, kan alma tüpü tam kapasite doldurulduğu zaman tam kan örneğinde K₂EDTA konsantrasyonunun yaklaşık 3 katı olan 5,7 mg/mL oranında test edildiğinde herhangi bir engelleyici özellik göstermemiştir. Heparin, coumadin (Warfarin), rivaroxaban (Xarelto) ve dabigatran etexilate (Pradaxa) **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testini engellememiştir.

Piyasadan temin edilebilen DNA ekstraksiyon tamponlarında yaygın olarak görülen bir madde olan Guanidin Hidroklorür içeren ticari bir ekstraksiyon tamponu genomik DNA örneklerinde %2,5'luk bir konsantrasyonda (h/h) var olduğu zaman **cobas®** Faktör II Faktör V Testini engellemiştir. Piyasadan temin edilebilen DNA izolasyon yöntemlerinin yıkama tamponlarında yaygın olarak karşılaşılan bir madde olan Etanol genomik DNA örneklerinde %5'luk bir konsantrasyonda (h/h) eklendiğinde **cobas®** Faktör II Faktör V Testini engellemiştir. Her iki madde için de, gözlemlenen engelleme geçersiz sonuçların alınmasına neden olmuştur.

Tekrarlanabilirlik, lotlar arası

cobas® Faktör II ve Faktör V Testinin lotlar arası tekrarlanabilirliği **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testinin üç lotuyla birlikte yedi adet K₂EDTA tam kan örneğinden izole edilen test amaçlı genomik DNA örnekleriyle değerlendirilmiştir. Çalışma iki operatör tarafından kullanılan iki **cobas z 480** analiz cihazıyla art arda olmayan beş gün boyunca yürütülmüştür, kit lotu başına günde bir çalışma yapılmış ve çalışma iki kez tekrarlanmış ve her örnek toplam 60 kez kullanılmıştır (Tablo 12). **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testi sonuçları iki yönlü Sanger DNA dizilemesiyle Faktör II ve Faktör V genotipleriyle karşılaştırılmıştır. **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testi sonuçları ve nükleik asit dizilemesi arasındaki genel uyum tüm örneklerde ve reaktif lotlarında %100'dür (tek taraflı, alt %95 güven sınırı %99,3).

Tablo 12 Lotlar arası tekrarlanabilirlik

Örnek Kimliği	Faktör II Genotipi	Faktör V Genotipi	Lot Başına Test Sayısı	Doğru Genotip Sonucu Sayısı (%)			
				Lot 1	Lot 2	Lot 3	Tüm Lotlar
S1	Yabanıl tip	Yabanıl tip	20	20(%100)	20(%100)	20(%100)	60(%100)
S2	Yabanıl tip	Yabanıl tip	20	20(%100)	20(%100)	20(%100)	60(%100)
S3	Yabanıl tip	Heterozigot	20	20(%100)	20(%100)	20(%100)	60(%100)
S4	Heterozigot	Yabanıl tip	20	20(%100)	20(%100)	20(%100)	60(%100)
S5	Yabanıl tip	Homozigot mutant	20	20(%100)	20(%100)	20(%100)	60(%100)
S6	Homozigot mutant	Yabanıl tip	20	20(%100)	20(%100)	20(%100)	60(%100)
S7	Heterozigot	Heterozigot	20	20(%100)	20(%100)	20(%100)	60(%100)
Toplam			140	140(%100)	140(%100)	140(%100)	420(%100)

Klinik performans değerlendirmesi

Yöntem korelasyonu: Sanger dizilemesiyle karşılaştırma

Kullanım amacına uygun örnek popülasyonunu temsil eden tam kan ve DNA örnekleri (toplam sayı=300) **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testiyle bir merkezde test edilmiştir. Farklı bir merkezde iki yönlü Sanger dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Bir K₂EDTA tam kan örneği alt setinden DNA ekstrakte etmek için piyasadan temin edilebilen bir manuel tam kan örneği hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Toplamda, 284 örnek tam kan örneğidir ve Faktör II ve V için sık rastlanan genotipleri temsil etmiştir. Nadir Faktör II Homozigot Mutantı/ Faktör V Yabanıl Tip genotip için örneklerin çoğunluğu, tanımlanmış bir izolasyon metodolojisi olmadan genomik DNA (gDNA) örnekleri olarak edinilmiştir. Genotipler ve numune tipleri Tablo 13'te sunulmuştur.

Tablo 13 Çalışmaya dahil edilen Faktör II ve Faktör V genotipleri ve numune tipleri

Faktör II (F2)	Faktör V (F5)	Numune Tipi
Yabanıl Tip (WT F2)	Yabanıl Tip (WT F5)	Tam Kan
Yabanıl Tip (WT F2)	Heterozigot (HET F5)	Tam Kan
Heterozigot (HET F2)	Yabanıl Tip (WT F5)	Tam Kan
Heterozigot (HET F2)	Heterozigot (HET F5)	Tam Kan
Yabanıl Tip (WT F2)	Homozigot Mutant (MUT F5)	Tam Kan
Homozigot Mutant (MUT F2)	Yabanıl Tip (WT F5)	Tam Kan ve gDNA

300 örneğin tümü iki yönlü Sanger dizilemesine ve **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testine göre geçerli sonuçlar çıkarmıştır. Bir test sonucu, hem **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testi hem de Sanger Dizilemesi aynı genotipi tespit ettiyse Faktör II veya Faktör V için doğru biçimde sınıflandırılmıştır. Bir test sonucu, hem **cobas®** Faktör II ve Faktör V Testi hem de Sanger Dizilemesi Faktör II veya Faktör V için farklı bir genotipi tespit ettiyse Faktör II veya Faktör V için yanlış biçimde sınıflandırılmıştır.

Faktör II için iki test arasındaki Genel Yüzde Uyum (OPA), %99,11 ile sınırlı %95 alt güven sınırıyla birlikte %100 çıkmıştır. Hem Pozitif Yüzde Uyum (PPA) hem de Negatif Yüzde Uyum (NPA) sırayla %98,24 ve %98,22 alt güven sınırlarıyla birlikte %100 çıkmıştır. Hem Heterozigot hem de Homozigot Mutant genotipleri için yüzde uyumu %100 çıkmıştır.

Faktör V için iki test arasındaki OPA değeri, %99,11 ile sınırlı %95 alt güven sınırıyla birlikte %100 çıkmıştır. Hem PPA hem de NPA değerleri PPA için %98,26 ve NPA için %98,19 alt güven sınırıyla birlikte %100 çıkmıştır. Hem Heterozigot hem de Homozigot Mutant genotipleri için yüzde uyumu %100 çıkmıştır.

Kombine sonuçlar Tablo 14'te sunulmuştur.

Tablo 14 Kombine Faktör II ve Faktör V sonuçlarının tanımlanması için referans olarak iki yönlü Sanger Dizilemesinin kullanıldığı cobas® Faktör II ve Faktör V Testinin Performansı

İki Yönlü Sanger Dizilemesi Sonucu	cobas® Faktör II ve Faktör V Testi Sonucu						Toplam
	HET F2/ HET F5	HET F2/ WT F5	MUT F2/ WT F5	WT F2/ HET F5	WT F2/ MUT F5	WT F2/ WT F5	
HET F2 / HET F5	25	0	0	0	0	0	25
HET F2 / WT F5	0	105	0	0	0	0	105
MUT F2 / WT F5	0	0	21	0	0	0	21
WT F2 / HET F5	0	0	0	105	0	0	105
WT F2 / MUT F5	0	0	0	0	23	0	23
WT F2 / WT F5	0	0	0	0	0	21	21
Toplam	25	105	21	105	23	21	300

Tekrar üretilebilirlik

Faktör II G20210A ve Faktör V Leiden (G1691A) mutasyonlarının tespit edilmesi ve genotiplemesi için kullanılan cobas® Faktör II ve Faktör V Testinin tekrar üretilebilirliği, dokuz elemanlı bir panelin kullanıldığı üç merkezde değerlendirilmiştir: dört benzersiz K₂EDTA kan örneği, üç adet yapay kan örneği ve 0,2 ng/μL oranında seyreltilmiş iki adet ekstrakte edilmiş genomik DNA (gDNA) örneği. Her merkez piyasadan temin edilebilen manuel örnek hazırlama yöntemlerinden birini kullanarak kan örneklerinden DNA ekstrakte etmiştir. Her merkezde, üç adet cobas® Faktör II ve Faktör V Test lotundan birisi ve bir cihaz, art arda olmayan 5 gün boyunca her operatör için günlük bir çalışma olacak şekilde bir merkezde iki operatör tarafından kullanılmıştır.

Doğru sonuç, cobas® Faktör II ve Faktör V Test sonucu ile Sanger dizilemesi ile belirlenen panel elemanı genotipi arasındaki uyumluluk olarak tanımlanmıştır; yanlış bir sonuç cobas test sonucu ile Sanger dizilemesi ile belirlenen panel elemanı genotipi arasındaki uyumsuzluk olarak tanımlanmıştır. cobas® Faktör II ve Faktör V Test sonuçları hem Faktör II hem de Faktör V için her örnekte raporlanmıştır ve her iki mutasyon için de geçerli ya da geçersiz olmuşlardır.

30 geçerli çalışma genelinde toplam 540 test gerçekleştirilmiştir: Bu testlerden 240'ı K₂EDTA kan örnekleriyle, 180'i yapay kan örnekleriyle ve 120'si ise gDNA örnekleriyle yapılmıştır. 540 sonuçtan sadece birinin geçersiz olduğu gözlemlenmiştir ve bu sonucun yapay bir kan örneğinden alındığı tespit edilmiştir. Tüm geçerli Faktör II ve Faktör V sonuçları doğru çıkmıştır ve bu sonuç her seviyede %100 uyumluluk getirmiştir: genotip, merkez/DNA izolasyon yöntemi/reaktif lotu, örnek tipi, operatörler ve günler. Genel geçersizlik oranı %0,19 çıkmıştır (1/540). Çalışma sonuçları Tablo 15 ve Tablo 16'da özetlenmiştir.

Tablo 15 Tekrar üretilebilirlik çalışmasının özeti - Faktör II

Dizilemeye Göre Genotip ^a	Doğru Sonuçlar/ Test Edilen Örnek Sayısı			Yanlış Sonuçlar	Geçersiz Sonuçlar ^c	Doğru Sonuçlar/ Geçerli Sonuç Sayısı	%95 LCB ^d
Faktör II	Merkez1 ^b / Lot 1 A Yöntemi	Merkez 2 ^b / Lot 2 B Yöntemi	Merkez 3 ^b / Lot 3 C Yöntemi				
WT ^e	100/100	100/100	100/100	0	0	300/300 (%100)	99,01
HET ^e	60/60	59/60	60/60	0	1	179/179 (%100)	98,34
MUT ^f	20/20	20/20	20/20	0	0	60/60 (%100)	95,13

^a WT: Yabancıl Tip; HET: Heterozigot; MUT: Homozigot Mutant

^b Her merkezde farklı bir DNA izolasyon yöntemi (A,B,C) ve farklı cobas® Faktör II ve Faktör V Test lotu kullanılmıştır.

^c Yeniden test edilmemiş geçersiz sonuç.

^d Tek Taraflı %95 Alt Güven Sınırı (LCB)

^e Her merkezde, 20 sonuç gDNA örneklerinden ve 20 sonuç ise yapay kan örneklerinden alınmıştır.

^f Sadece yapay kan örneklerinden alınmış

Tablo 16 Tekrar üretilebilirlik çalışmasının özeti - Faktör V

Dizilemeye Göre Genotip ^a	Doğru Sonuçlar/ Test Edilen Örnek Sayısı			Yanlış Sonuçlar	Geçersiz Sonuçlar ^c	Doğru Sonuçlar/ Geçerli Sonuç Sayısı	%95 LCB ^d
Faktör V	Merkez1 ^b / Lot 1 A Yöntemi	Merkez 2 ^b / Lot 2 B Yöntemi	Merkez 3 ^b / Lot 3 C Yöntemi				
WT ^e	100/100	100/100	100/100	0	0	300/300 (%100)	99,01
HET ^e	60/60	59/60	60/60	0	1	179/179 (%100)	98,34
MUT ^f	20/20	20/20	20/20	0	0	60/60 (%100)	95,13

^a WT: Yabancıl Tip; HET: Heterozigot; MUT: Homozigot Mutant

^b Her merkezde farklı bir DNA izolasyon yöntemi (A,B,C) ve farklı cobas® Faktör II ve Faktör V Test lotu kullanılmıştır.

^c Yeniden test edilmemiş geçersiz sonuç.

^d Tek Taraflı %95 Alt Güven Sınırı (LCB)

^e Her merkezde, 20 sonuç gDNA örneklerinden ve 20 sonuç ise yapay kan örneklerinden alınmıştır.

^f Sadece yapay kan örneklerinden alınmış

Ek bilgiler

Semboller

Aşağıdaki semboller Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılır.

Tablo 17 Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılan semboller



Yardımcı Yazılım



In Vitro Diagnostik Amaçlı Tıbbi Cihaz



Avrupa Birliği'ndeki Yetkili Temsilci



Belirlenen Aralığın Alt Limiti



Barkod Bilgi Formu



Üretici



Parti kodu



Karanlık bir ortamda muhafaza edin



Biyolojik riskler



<n> test için yeterli miktarda içerir



Katalog numarası



Sıcaklık Sınırı



Kullanım yönergelerine bakın



Test Tanım Dosyası



Kit içeriği



Belirlenen Aralığın Üst Limiti



Dağıtımçı



Son Kullanma Tarihi



Sadece IVD Performans Değerlendirmesi için



Küresel Ticaret Ürün Numarası



Bu ürün, *in vitro* diagnostik amaçlı tıbbi ürünlerle ilgili 98/79 EC sayılı Avrupa Direktifinin gerekliliklerini karşılamaktadır.

ABD için Müşteri Teknik Destek Hattı 1-800-526-1247

Üretici ve distribütörler

Tablo 18 Üretici ve distribütörler



Roche Molecular Systems
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com



Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguará, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877-273-3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

Ticari markalar ve patentler

Bkz. <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Telif Hakkı

©2017 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Referanslar

1. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. Arch Intern Med. 1998;158;585-593.
2. Goldhaber SZ, Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. Lancet. 2012; 379:1835-1846.
3. Grody WW, GJ Taylor AK, Korf BR, Heit JA. American College of Medical Genetics, A consensus statement on Factor V Leiden mutation testing. Genet Med. 2001; 2001;3:139-148.
4. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP et al. High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). Blood. 1995; 85:1504-1508.
5. Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, et al. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Genet Med. 2005;7:444-453.
6. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, Korf BR, Heit JA, ACMG Factor V Leiden Working Group. American College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing. . Genet Med. 2001;3:139-148.
7. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996;88:3698-3703.
8. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990;93:125-128.
9. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
11. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP07-A2 Appendix D: Wayne, PA; CLSI, 2005.

Belge revizyonu

Belge Revizyonu Bilgileri	
Doc Rev. 1.0 09/2017	Birinci Basım.