



Epi proColon 2.0 CE

Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001)

Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Kiti (M5-02-002)

Epi proColon Kontrol Kiti (M5-02-003)

Önemli!

Yalnızca güncel kullanım kılavuzunu kullanın.

Test prosedürüne başlamadan evvel, <http://www.epiprocolon.com/en/e-support-library/instructions-for-use.html> adresinden en son sürümü edindiğinizden emin olun.

Kullanımdan önce, kullanım talimatları dikkatlice okunmalı ve güvenilir sonuçlar elde etmek için kullanım talimatlarına uyulmalıdır.

IFU 0009 GB, rev 7, copyright©, 09 Eylül 2016, Epigenomics AG

REF M5-02-001, M5-02-002, M5-02-003

Epigenomics AG, Geneststr. 5
10829 Berlin, Almanya

epigenomics

İçindekiler	
1. İsim ve Kullanım Amacı	3
2. Özet ve Açıklama	3
3. Prosedürün prensipleri	3
4. Temin Edilen Malzemeler	4
4.1. İçindekiler	4
4.2. Güvenlik Bilgileri	4
5. Depolama ve Sağlamlık	5
5.1. Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001)	5
5.2. Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Kiti (M5-02-002)	6
5.3. Epi proColon Kontrol Kiti (M5-02-003)	6
6. Gerekli olan, fakat temin edilemeyen malzemeler	6
6.1. Genel Laboratuvar Ekipmanları	6
6.2. Genel Laboratuvar Sarf Malzemeleri ve Reaktifler	6
6.3. Gerekli olan Özel Ekipmanlar ve Sarf Malzemeleri	7
6.4. Kurulum Gereksinimleri	8
7. Uyarılar ve Önlemler	8
7.1. Laboratuvar Önlemleri	8
7.2. Mikrobiyolojik ve İnfeksiyöz Durum	8
8. Numune Toplama ve Muamelesi	8
8.1. Kan Alma ve Kan Örneğinin Saklanması	8
8.2. Plazma Örneği Hazırlama ve Plazma Örneğinin Saklanması	9
9. Test Prosedürü	9
9.1. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	9
9.2. Hasta Plazmasından DNA Ekstraksiyonu ve Bisülfid Dönüşüm	10
9.3. PCR Ayarı	13
10. Applied Biosystems 7500 Fast ve 7500 Fast Dx PCR Cihazlarıyla Analiz	15
10.1. Yazılım Gereksinimleri	15
10.2. PCR Plaka Hazırlama (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)	15
10.3. Plaka Yükleme (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)	15
10.4. Analiz Ayarları (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)	18
10.5. Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerliliği (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)	19
10.6. Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)	19
11. Roche LightCycler 480 Cihazı I ile Analiz	20
11.1. Plaka Hazırlama (LightCycler 480 Cihaz I)	20
11.2. Plaka Yükleme (LightCycler 480 Cihaz I)	20
11.3. Analiz Ayarları (LightCycler 480 Cihaz I)	20
11.4. Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerliliği (LightCycler 480 Cihaz I)	21
11.5. Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (LightCycler 480 Cihaz I)	22
12. Roche LightCycler 480 Cihazı II ile Analiz	23
12.1. Plaka Hazırlama (LightCycler 480 Cihaz II)	23
12.2. Plaka Yükleme (LightCycler 480 Cihaz II)	23
12.3. Analiz Ayarları (LightCycler 480 Cihaz II)	23
12.4. Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerliliği (LightCycler 480 Cihaz II)	25
12.5. Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (LightCycler 480 Cihaz II)	25
13. Hasta Örneği için Sonuçların Yorumlanması	26
14. Kalite Kontrol	26
14.1. Harici Kontroller	26
14.2. Dâhili Kontroller	26
15. Prosedürün Kısıtlamaları	27
16. Performans Özellikleri	27
16.1. Analitik Hassasiyet	27
16.2. Yeniden Üretilbilirlik	27
16.3. Klinik Duyarlılık ve Özgüllük	27
16.4. İki Gerçek Zamanlı PCR cihazının Uyumunu	28
16.5. İnterferans	28
17. Sembollerin Anlamları	29
18. Kaynakça	30
19. İletişim Bilgileri	30

1. İsim ve Kullanım Amacı

Epi proColon 2.0 CE, insan plazma örneklerinden elde edilen bisülfıt dönüştürülen DNA içerisinde, metillenmiş Septin 9 DNA'nın gerçek zamanlı PCR tespiti için kullanılan nitel bir deneydir. Metillenmiş Septin 9'un varlığı, kolorektal kanserin saptanması ile ilişkili olup; bu tür kanserin saptanmasına yardımcı olabilir.

Epi proColon 2.0 CE, Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001), Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon Kiti (M5-02-002) ve Epi proColon Kontrol Kitinden (M5-02-003) oluşmaktadır.

2. Özet ve Açıklama

Epi proColon 2.0 CE, 3,5 ml hasta plazmasından izole edilmiş DNA içerisinde Septin 9 geninin metilasyonun nitel olarak saptanması için kullanılan *in vitro* bir polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR). Kolorektal kanser (CRC) dokusunda, Septin 9 geni üzerindeki v2 bölgesinde bulunan sitozin kalıntılarında metillenme gözlemlenirken; normal kalın bağırsak mukozasında metillenme olmaz. Bu anormal metilasyon, kan akışında bulunan DNA'nın özel amplifikasyonu ile saptanabilir. Septin 9 metilasyon biyobelirteci kullanılarak plazma içerisinde CRC DNA saptanması, CRC hastaları üzerinde yapılan çoğul vaka kontrol çalışmalarında ve kolonoskopi ile doğrulanmış negatif kontroller üzerinde gösterilmiştir¹⁻³. Kan bazlı Epi proColon 2.0 CE, kolonoskopik taramayı reddeden hastalar için, non-invaziv CRC tarama seçeneklerine karşı uygun bir alternatif sunmaktadır.

3. Prosedürün prensipleri

Epi proColon 2.0 CE, iki adımdan oluşur. Birinci adımda, plazmadan DNA çıkartılır ve Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001) vasıtasıyla saflaştırılmış DNA'nın bisülfıt dönüşümü gerçekleştirilir. İkinci adımda, giren DNA miktarının yeterliliğini değerlendirmek için, hem hedef metillenmiş Septin 9 DNA'yı, hem de dâhili kontrol olan ACTB'yi (β-aktin) saptayan Epi proColon Hassas PCR Kiti (M5-02-002) kullanılarak, çift yönlü PCR içerisinde bisülfıt dönüştürülmüş DNA (bisDNA) analiz edilir. Epi proColon Kontrol Kiti (M5-02-003) ile gerçekleştirilen kontroller, her bir çalışma için pozitif ve negatif kontrol şeklinde olmalıdır.

Hasta plazması dâhilinde bulunan DNA'nın ekstraksiyonu, serbest dolaşan DNA'nın, plazmadan daha sonra manyetik olarak ayrılan manyetik parçacıklara bağlanmasına dayanır. Kalan safsızlıklar, yıkama aşamasında manyetik parçacıklardan ayrıştırılır. Elüsyon aşamasında, manyetik parçacıklar elüsyon tamponunda çözülerek saflaştırılmış DNA'dan ayrılır. Eluat içeren DNA, özellikle DNA içerisindeki metillenmemiş sitozin kalıntılarını etkileyen kimyasal reaksiyona tabi olur. Bisülfıt uygulaması, DNA metilasyonunun analizi için tercih edilen yöntem olarak kullanılmaktadır. Dönüşüm, bisülfıt iyonunun, sitozin nükleotidine nükleofilik katılması ve sonraki urasil sülfonat ortaya çıkarmak için deaminasyon reaksiyonuna bağlıdır; bu esnada, 5-metilsitozin (metillenmiş sitozin) deaminasyon reaksiyonuna girmez ve değişmeden kalır.

Sonraki PCR reaksiyonunda kullanılan blokerler ve proplar, metillenmiş ve metillenmemiş sekansları ayırır. Epi proColon 2.0 CE, Septin 9 geninde bulunan v2 bölgesi dâhilindeki metillenmiş CpG bölümlerini içeren bisDNA sekanslarını ve ACTB geninin bir bölümünde bulunan toplam bisDNA'yı saptar. Çift deneyin Septin 9 bölümü, CpG dinükleotidlerinin bulunmadığı bölgelerde konumlanmış primerlerden oluşur. Bölge dâhilinde bulunan bisülfıt dönüşümlü metillenmemiş sekanslar için özel bir bloker, metillenmiş sekansların güçlendirilmesi için eklenir. PCR reaksiyonu⁴ sırasında özellikle güçlendirilmiş metillenmiş sekansları tanımlamak için, reaksiyonda, metillenmiş Septin 9'a özel floresan tespit probu kullanılır.

4. Temin Edilen Malzemeler

4.1. İçindekiler

Tablo 1: Epi proColon Plazma Hızlı Kiti içindekiler

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
Epi proColon Lizis Bağlama Tamponu	1 şişe	125 ml	15° C ila 30° C arası
Epi proColon Yıkama A Konsantresi	1 şişe	60 ml	15° C ila 30° C arası
Epi proColon Manyetik Boncuklar	1 şişe	4 ml	15° C ila 30° C arası
Epi proColon Yıkama B Konsantresi	1 şişe	7 ml	15° C ila 30° C arası
Epi proColon Elüsyon Tamponu	1 tüp	6 ml	15° C ila 30° C arası
Epi proColon Bisülfid Çözeltisi	4 tüp	her biri 1,9 ml	15° C ila 30° C arası
Epi proColon Koruma Tamponu	1 tüp	1 ml	15° C ila 30° C arası

Not: Epi proColon Koruma Tamponunun rengi, şeffaf ve kahverengiye yakın bir renk arasında değişiklik gösterebilir.

Tablo 2: Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Kiti içindekiler

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
Epi proColon PCR Karışım	2 tüp	her biri 810 µl	-25° C ila -15° C arası
Epi proColon Polimeraz	1 tüp	85 µl	-25° C ila -15° C arası

Tablo 3: Epi proColon Kontrol Kiti içindekiler

Reaktif	Kaplar	Hacim	Saklama Sıcaklığı
Epi proColon Negatif Kontrol	6 tüp	her biri 3,65 ml	-25° C ila -15° C arası
Epi proColon Pozitif Kontrol	6 tüp	her biri 3,65 ml	-25° C ila -15° C arası

4.2. Güvenlik Bilgileri

Kimyasallarla çalışırken, her zaman laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldiven kullanın. Kontamine olmuş yüzeyleri, suyla temizleyin. Daha fazla bilgi için, internet sayfamızda (<http://www.epiprocolon.com/en/e-support-library/safety-data-sheets.html>) bulunan malzeme güvenliği veri sayfasına bakınız.

Epi proColon Lizis Bağlama Tamponu ve Epi proColon Yıkama A Konsantresi, TRITON X-100 ve Guanidinyum tiyosiyanat içerir.

Tehlike açıklamaları: H302: Yutulması halinde zararlıdır. H312: Ciltle temas etmesi halinde zararlıdır. H318: Ciddi göz hasarına neden olur. H332: Solunması halinde zararlıdır. H412: Kalıcı etkileriyle su yaşamına karşı zararlıdır. EUH032: Asitlerle teması, çok toksik gazlar ortaya çıkarır.



TEHLİKE

Önlem açıklamaları: P261: Aerosolleri solumaktan kaçının. P273: Çevreye salınmasından kaçının. P301 + P312: YUTULMASI HALİNDE: İyi hissetmiyorsanız; bir ZEHİR MERKEZİ'ni veya doktoru arayınız. P302 + P352: CİLTLE TEMAS ETMESİ HALİNDE: Bol sabun ve su ile yıkayınız. P305 + P351 + P338: GÖZLERLE TEMAS ETMESİ HALİNDE: Birkaç dakika boyunca, bol suyla dikkatlice durulayın. Kontak lensleriniz varsa ve çıkarması kolaysa, çıkarın. Durulamaya devam edin.

Epi proColon Bisülfid Çözeltilisi, Amonyum bisüfitin sulu çözeltisini (Amonyum hidrojen sülfid)içerir



UYARI

Tehlike açıklamaları: H319: Ciddi göz iritasyonuna yol açar. EUH031: Asitlerle teması halinde, zehirli gaz salınır.

Önlem açıklamaları: P264: Kullandıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın. P271: Sadece dışarıda veya iyi havalandırılmış mekanlarda kullanın. P280: Koruyucu eldiven/koruyucu giysi kullanın. P305+351+338: GÖZLERLE TEMAS ETMESİ HALİNDE: Birkaç dakika boyunca, bol suyla dikkatlice durulayın. Kontak lensleriniz varsa ve çıkarması kolaysa, çıkarın. Durulamaya devam edin. P312: İyi hissetmiyorsanız; bir ZEHİR MERKEZİ'ni veya doktoru arayınız.

Epi proColon Koruma Tamponu, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit ve Tetrahidro furfural alkol içerir.



TEHLİKE

Tehlike açıklamaları: H302: Yutulması halinde zararlıdır. H315: Ciltte tahrişe yol açar. H319: Ciddi göz iritasyonuna yol açar. H360Df: Doğmamış bebeğe zarar verebilir. Fertiliteye zarar verme riski. H335: Solunum iritasyonuna yol açabilir.

Önlem açıklamaları: P101: Tıbbi öneri gerekmesi halinde, ürün kabını veya etiketini ulaşılabilir bir yerde bulundurunuz. P102: Çocukların ulaşamayacakları yerlerde saklayınız. P201: Kullanmadan önce özel talimatları edinin. P271: Sadece açık alanda veya iyi havalandırılmış bir yerde kullanın. P280: Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın. P305 + P351 + P338: GÖZLERLE TEMAS ETMESİ HALİNDE: Birkaç dakika boyunca, bol suyla dikkatlice durulayın. Kontak lensleriniz varsa ve çıkarması kolaysa, çıkarın. Durulamaya devam edin. P308+P313: Maruz kalınırsa veya temas edilirse: Tıbbi yardım/bakım alın. P405: Kilitli yerde saklayın.

Epi proColon Yıkama B Konsantresi, Epi proColon Elüsyon Tamponu, Epi proColon Manyetik Boncuklar, Epi proColon PCR Karışım, Epi proColon Polimeraz, Epi proColon Pozitif Kontrol ve Epi proColon Negatif Kontrol zararlı değildir.

5. Depolama ve Sağlamlık

Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001), Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon Kiti (M5-02-002) ve Epi proColon Kontrol Kiti (M5-02-003) ile birlikte verilen reaktifler, talimatlara uygun şekilde kullanılması ve saklanması durumunda, son kullanma tarihine kadar dayanır. Son kullanma tarihi geçmiş ürünleri kullanmayın. Farklı kitlerden reaktifleri karıştırmayın.

5.1. Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001)



Epi proColon Plazma Hızlı Kiti içinde tüm reaktifleri, 15 ila 30°C arasında saklayınız.

Epi proColon Bisülfid Çözeltilisi, oksijenle temasa karşı hassastır. Sadece açılmamış Epi proColon Bisülfid Çözeltili tüplerini kullanın. Kullanılmış tüpleri iskartaya çıkartın!

Seyretilmiş Epi proColon Yıkama A Tamponu ve seyretilmiş Epi proColon Yıkama B Tamponunu, 6 haftaya kadar 15 ve 30°C arasında saklayın.

İlk kullanım sonrasında, tüm reaktifleri, 6 haftaya kadar 15 ve 30°C arasında saklayın.

5.2. Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Kiti (M5-02-002)



Epi proColon PCR Karışım ve Epi proColon Polimeraz'ı, -25 ve -15°C arasında saklayın.
Her bir Epi proColon PCR Karışım tüpü, tek bir sefer eritilebilir ve yeniden dondurulabilir. İlk kullanım sonrasında, tüm reaktifleri, 6 haftaya kadar -25 ve -15°C arasında saklayın.

5.3. Epi proColon Kontrol Kiti (M5-02-003)



Epi proColon Kontrol Kiti'ni, -25 ve -15°C arasında saklayın.

6. Gerekli olan, fakat temin edilemeyen malzemeler

6.1. Genel Laboratuvar Ekipmanları

Epi proColon 2.0 CE testini gerçekleştirmek için, aşağıda belirtilen genel laboratuvar ekipmanları gereklidir. Tüm laboratuvar ekipmanları, üreticinin tavsiyeleri uyarınca kurulmalı, ayarlanmalı, çalıştırılmalı ve bakımı yapılmalıdır.

Gerekli Ekipmanlar	Önerilen Ekipmanlar
15 ml tüpler ve 2 ml tüpler için tüp rafları	VWR International, katalog no. 211-0200, veya dengi
Rotator	VWR International, katalog no. 445-2102; Carl Roth GmbH + Co. KG, katalog no Y549.1 veya dengi
Vorteks	VWR International, katalog no. 444-1 372, veya dengi
2 ml tüpler için ısıtıcı karıştırıcı	ThermoMixer® C, Eppendorf, katalog no. 5382 000.015, 2 ml kuru ısıtma bloğu, Eppendorf, katalog no. 5362 000.035, veya dengi (Isıtıcı karıştırıcının sıcaklık hassasiyeti: 23 - 80°C'de $\pm 2^\circ\text{C}$)
10 - 100 μl , 100 - 1000 μl boyutunda ayarlanabilen hacimlerde pipetler	Eppendorf Reference®, ayarlanabilir hacimli pipet, Eppendorf, katalog no. 4910 000.042 ve 4910 000.069, veya dengi
Ayarlanabilir aralıkta, tekrarlanabilir şekilde hacim dağıtabilen tekrar pipeti	Eppendorf Multipette® M4, Eppendorf, katalog no. 4982 000.012, veya HandyStep® elektronik, Marka, katalog no. 705000/705001, veya dengi
1,5-2,0 ml tüpler için rotorlu tezgah üstü santrifüj	Santrifüj 5418, Eppendorf, katalog no. 5418 000.01 7 rotorlu 5490 15.002, Eppendorf, katalog no. 5490 015.002 veya dengi
Çok kanallı pipet	Eppendorf Research® plus 8-Kanallı, 10 – 100 μl Eppendorf, katalog no. 31 22 000.035, veya dengi
PCR plakaları için uyumlu plaka santrifüj	Santrifüj 5804 R, Eppendorf, katalog no. 5804 0.013 7 rotorlu A-2-DWP, Eppendorf, katalog no. 5804 740.009 veya dengi
100 ml dereceli silindir veya 50 ml serolojik pipet	Carl Roth, katalog no. C1 77,2, veya dengi, veya Fisher Scientific, katalog no. 11889181, veya dengi

6.2. Genel Laboratuvar Sarf Malzemeleri ve Reaktifler

Sarf Malzemeleri ve Reaktifler	Önerilen Sarf Malzemeleri ve Reaktifler
Mutlak etanol (moleküler biyoloji için, $\geq 99.5\%$)	Merck KGaA, katalog no. 1.08543.0250, veya dengi
Altı konik, 15 ml polipropilen santrifüj tüpleri, PP/steril	Sarstedt, katalog no. 62.554.502, veya dengi
Altı yuvarlak ve kapaklı sızdırmazlık mekanizmalı PP kapaklı 2,0 ml mikrotüpler	Sarstedt SafeSeal, katalog no. 72.695.400 veya Eppendorf Safe-Lock™, katalog no. 0030 120.094, veya dengi
Aerosol engelli pipet uçları	ep Dualfilter T.I.P.S.®, Eppendorf: ■ 2 - 100 μl , katalog no. 0030 077.547, veya dengi ■ 50 - 1000 μl , katalog no. 0030 077.571, veya dengi

Sarf Malzemeleri ve Reaktifler	Önerilen Sarf Malzemeleri ve Reaktifler
0,5 ml, 1 ml, 10 ml, 25 ml hacimleri için tekrarlayan pipet uçları	Combitips advanced®, Eppendorf: ■ 0.5 ml, katalog no. 0030 089.421, veya dengi ■ 1 ml, katalog no. 0030 089.430, veya dengi ■ 10 ml, katalog no. 0030 089.464, veya dengi ■ 25 ml, katalog no. 0030 089.472, veya dengi
Steril olmayan döküm paketli, 15 cm boyunda (yaklaşık 6 inç), sap çapı 5mm, hacmi yaklaşık 5 ml olan tek kullanımlık aktarma pipetleri	VWR Referans Çizgili Steril olmayan Tek Kullanımlık Aktarma Pipetleri, katalog no. 612-4520 veya dengi
Steril olmayan döküm paketli, 22.5 cm boyunda (yaklaşık 9 inç), sap çapı 5 mm, hacmi yaklaşık 5 m olan tek kullanımlık aktarma pipetleri	Tek kullanımlık aktarma pipeti, dereceli, Carl Roth, katalog no. EA61.1 veya dengi
DNA saklama için 96 mikrolaka	MicroAmp® Fast 96-Hazneli Reaksiyon Mikrolaka, 0,1 ml , Applied Biosystems (Life Technologies Co.), katalog no. 4346906, veya dengi
DNA saklama plakası için yapışkan film veya folyo	VWR Thermalseal PCR Yapıştırıcı Film, katalog no. 391-1254 veya Eppendorf Saklama Folyosu (kendinden yapışkanlı), katalog no. 0030 127.889, veya dengi
Mikrolaka ve yapışkan film arasında sızdırmazlık uygulayıcı	MicroAmp® Yapışkan Film Uygulayıcı, Applied Biosystems, katalog no. 4333183
Kullanılmış PCR plakalarını bertaraf etmek için 10x15 cm yeniden kapanabilir plastik torbalar	Carl Roth, katalog no. P279.2, veya dengi
Cryovial, 5 ml, dikilebilir	VWR, katalog no. 479-1218, veya benzeri
Kan alma tüpleri	■ BD Vacutainer® K ₂ EDTA 10 ml Kan Alma Tüpleri (Becton Dickinson, katalog no. 367525) veya ■ S-Monovette® 9 ml K3E (Sarstedt katalog no. 02.1066.001) veya ■ S-Monovette® 8.5 ml CPDA (Sarstedt katalog no. 01.1610.001)

6.3. Gerekli olan Özel Ekipmanlar ve Sarf Malzemeleri

Epi proColon 2.0 CE testini gerçekleştirmek için, aşağıda belirtilen özel laboratuvar ekipmanları ve sarf malzemeleri gerekli olup, yerlerine başka ekipmanlar kullanılamaz.

Applied Biosystems 7500 Fast veya 7500 Fast Dx PCR cihazlarıyla Epi proColon 2.0 CE testi uygularken:

- Applied Biosystems 7500 Fast Dx Windows XP için Sekans Saptama Yazılımı v1.4 21 CFR Part 11 Modüllü veya Windows 7 için Sekans Saptama Yazılımı v1.4.1 21 CFR Part 11 Modüllü Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (Life Technologies Co., katalog no. 4406984 veya 4406985) veya

Applied Biosystems 7500 Fast Dx Windows XP için Sekans Saptama Yazılımı v1.4 21 CFR Part 11 Modüllü (Life Technologies Co., katalog no. 4351106 veya 4351107) veya Windows 7 için Sekans Saptama Yazılımı v1.4.1 21 CFR Part 11 Modüllü Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (Life Technologies Co., katalog no. 4377355)

- MicroAmp® Fast Barkodlu Optik 96-Hazneli Reaksiyon Mikrolaka, 0,1 ml (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 20 plaka, katalog no. 4346906; 200 plaka, katalog no. 4366932)

MicroAmp® 96- & 384-Hazneli Mikrolakalar için Optik Yapışkan Film (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 25 levha, katalog no. 4360954 veya 100 levha, katalog no. 4311971)

Roche LightCycler 480 cihazları I Epi proColon 2.0 CE testi uygularken:

- 96-hazneli mikrolaka için ısıtıcı bloklu (Roche, katalog no. 05015278001) ve 1.5.x Yazılım sürümlü LightCycler 480 Cihaz I veya

96-hazneli mikrolaka için ısıtıcı bloklu (Roche, katalog no. 5015278001) ve 1.5.x Yazılım sürümlü LightCycler 480 Cihaz II

- Sızdırmazlık folyosu (Roche, katalog no.04729692001) LightCycler 480 Çoklu Hazneli Mikrolaka 96 (beyaz plaka)

- LightCycler 480 Sızdırmazlık Folyosu (Roche, katalog no. 04729757001)

Tüm Gerçek Zamanlı PCR cihaz ayarlarıyla uyumlu ve gerekli olan ek ekipmanlar:

- Manyetik Ayırıştırıcı: DynaMag™-15 mıknatıs (Invitrogen, katalog no. 123.01 D)
- Manyetik Ayırıştırıcı: DynaMag™-2 mıknatıs (Invitrogen, katalog no. 123.21 D)

6.4. Kurulum Gereksinimleri

Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR Cihazı, Applied Biosystems 7500 Fast PCR Cihazı veya Roche LightCycler 480 Cihazı I veya II'nin kurulumu, kalibrasyonu, performans doğrulaması ve bakımı, üreticinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

Not: Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR cihazı ve Applied Biosystems 7500 Fast PCR Cihazı için, üreticinin bakım prosedürleri dâhilinde tanımlanan şekilde aylık arka plan kalibrasyonu yapılması zorunludur. Applied Biosystems 7500 Fast Dx ve 7500 Fast PCT Cihazları için, FAM™, JOE™, TAMRA™ saf boyalarının kalibrasyonu dâhil olmak üzere, üreticinin talimatları uyarınca altı aylık bakımlar yapılmalıdır.

7. Uyarılar ve Önlemler

7.1. Laboratuvar Önlemleri

DNA ekstraksiyonu, bisülfid dönüşümü ve saflaştırma işlemi esnasında ve sonrasında numuneler arasında çapraz kontaminasyon riskini asgariye indirmek için, iyi laboratuvar uygulamalarına uymak önemlidir.

Ekstraksiyon işlemi esnasında, nükleazların numunelere karışmasını engelleyin. Hasta numunelerinin çapraz kontaminasyonunu engellemek için tek kullanımlık pipet ve pipet ucu kullanılmasını öneriyoruz. Bu işlem yalnızca profesyonel laboratuvar kullanımı içindir ve DNA ekstraksiyon yöntemleri ve gerçek zamanlı PCR denemelerini bilmeyi gerektirir.

Daha önce gerçekleştirilmiş olan PCR'da oluşan ampikonlardan ötürü olabilecek kontaminasyonu engellemek için, PCR öncesi faaliyetlerin (ör. plazma DNA ekstraksiyonu ve pürifikasyon, PCR düzeneği) ve PCR sonrası faaliyetlerin (ör. gerçek zamanlı PCR) kesin olarak ayrılmasını tavsiye ederiz. Buna ek olarak, kullanılmış PCR plakaları, hiçbir PCR ürününün serbest kalmasını engelleyecek şekilde bertaraf edilmesini tavsiye ederiz. Ör. kullanılan PCR plakaları, PCR cihazından çıkartıldıktan hemen sonra tekrar kapanabilir plastik bir torba içerisine koyulmalıdır; torba kapatılmalı ve özel çöp kutusu içerisinde bertaraf edilmelidir. Kullanılmış bir PCR plakasını, hiçbir zaman PCR cihazı dışında saklamayın. Kullanılmış PCR plakasını hiçbir zaman açmayın.

7.2. Mikrobiyolojik ve Enfeksiyöz Durum

Ürün, insanlarda veya hayvanlarda hastalığa neden olan enfeksiyöz madde veya ajanlar içermez.

Bu deney kullanılarak analiz edilen insan kan ve plazma örnekleri, Mikrobiyolojik ve Biyomedikal Laboratuvarlarında Biyogüvenlik ve işyerinde biyolojik ajanlara maruz kalmaya ilişkin risklerden çalışanları korumak için Yönetmelik 2000/54/EC dâhilinde belirtilen güvenli laboratuvar işlemleri veya diğer geçerli biyogüvenlik uygulamaları kullanılarak, potansiyel enfeksiyöz olarak kullanılmalıdır.

8. Numune Toplama ve Muamelesi

8.1. Kan Alma ve Kan Örneğinin Saklanması

Kan alma ve kan örneğinin saklanması, aşağıda belirtilen durum(lar) dâhilinde gerçekleştirilebilir:

- Kan almak için, BD Vacutainer® K₂EDTA 10 ml tüp veya S-Monovette® 9 ml K3E kullanın. Kan alımını gerçekleştirmek için, üreticinin tavsiyelerini uygulayın. Kan, derhal işlenmelidir. Plazma hazırlanmadan önce kan, en fazla 24 saate kadar, 2 ila 8°C arasında saklanabilir. Kan örneklerini dondurmamıştır.

• Alternatif olarak, kan alımı için S-Monovette® 8.5 ml CPDA tüpleri kullanılabilir. Kan alımını gerçekleştirmek için, üreticinin tavsiyelerini uygulayın. Kan, derhal işlenmelidir. Kan, S-Monovette® 8,5 ml CPDA tüpü içerisinde en fazla 48 saat boyunca, 15 ila 25°C saklanabilir. Kan örneklerini dondurmayınız.

8.2. Plazma Örneği Hazırlama ve Plazma Örneğinin Saklanması

- Hücre tabakasının bozulmasını engellemek için, santrifüj içerisindeki fren işlevini devre dışı bırakın.
- Kan alma tüpü içerisindeki kanı, 12 dakika boyunca 1350 ± 150 rcf devir hızında santrifüjleyin. Dakikadaki devir hızını (rpm), rcf'ye çevirmek için, santrifüj kullanım kılavuzuna bakın.
- Kan alma tüpünü, santrifüjden çıkartın.
- Kan alma tüpü içerisindeki plazmayı, konik altlı 15 ml polipropilen santrifüj tüpünün içerisine aktarmak için; yeni bir 15 cm tek kullanımlık aktarma pipeti kullanın.
- Santrifüj tüpü içerisindeki plazmayı, 12 dakika boyunca 1350 ± 150 rcf devir hızında santrifüjleyin.
- 3,5 ml plazmayı, cryovial veya santrifüj tüpü içerisine aktarmak için, yeni bir ekstra uzun (22,5cm) tek kullanımlık aktarma pipeti veya serolojik pipet kullanın.
- Plazma örnekleri, 4 haftaya kadar -15 ve -25°C arasında saklanabilir.
- Vacutainer® K₂EDTA 10 ml tüp kullanılırken plazma örneği, 18 saate kadar 2 ila 8°C arasında saklanabilir.

Not: İlk santrifüjleme sonrasında, kan toplama tüpü içerisindeki kırmızı kan hücreleri üzerinde katman haline gelmiş veya ikinci santrifüjleme sonrasında konik santrifüjün dibine çöken beyaz kan hücrelerinin dağılmaması veya aktarılmaması için özen gösterin.

9. Test Prosedürü

Aşağıda belirtilen reaktiflerin tekrar hazırlanması için yinelenen pipet kullanımı tavsiye edilir:

- Epi proColon Lizis Bağlama Tamponu
- Epi proColon Manyetik Boncuk Askısı
- DNA Bağlayıcı Adım 9.2.3 için etanol
- Epi proColon Yıkama A Tamponu
- Epi proColon Yıkama B Tamponu
- Epi proColon Elüsyon Tamponu
- Epi proColon Bisülfid Çözeltilisi
- Epi proColon Koruma Tamponu ve PCR Ana Karışım

Buna ek olarak, salınlı platform yerine dönme dolap benzeri rotator kullanılmasını ve referans pipetlerle, çıkartılmış ve bisülfitle muamele edilmiş DNA'nın pipetlenmesini şiddetli tavsiye ederiz.

9.1. Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

9.1.1 Epi proColon Yıkama A Tamponunun Hazırlanması

- Derecelendirilmiş steril silindir veya serolojik pipet kullanarak, Epi proColon Yıkama A Konsantresine, 60,0 ml Mutlak Etanol (moleküler biyoloji için, >99,5) ekleyin.
- Kapağı kapatın, köpük oluşumundan kaçınarak, şişeyi beş defa ters çevirmek suretiyle iyice karıştırın. Şişe üzerine, seyreltme tarihini yazın ve "Etanol eklenmiştir" kutucuğunu işaretleyin.
- Seyretilmiş Epi proColon Yıkama A Tamponu, 6 haftaya kadar 15 ve 30°C arasında saklayın.

9.1.2 Epi proColon Yıkama B Tamponunun Hazırlanması

- Derecelendirilmiş steril silindir veya serolojik pipet kullanarak, Epi proColon Yıkama B Konsantresine, 40,0 ml Mutlak Etanol (moleküler biyoloji için, ≥99,5) ekleyin.
- Kapağı kapatın, şişeyi beş defa ters çevirmek suretiyle iyice karıştırın. Şişe üzerine, seyreltme tarihini yazın ve "Etanol eklenmiştir" kutucuğunu işaretleyin.
- Seyretilmiş Epi proColon Yıkama B Tamponu, 6 haftaya kadar 15 ve 30°C arasında saklayın.

9.2. Hasta Plazmasından DNA Ekstraksiyonu ve Bisülfıt Dönüşüm

Epi proColon 2.0 CE içerisinde kontroller dâhil olmak üzere, 32 numuneye kadar yeterli olacak reaktif bulunur. Her bağımsız test denemesine, bir Epi proColon Pozitif Kontrol ve bir Epi proColon Negatif Kontrol dâhil edilmelidir. Azami olarak 4 bağımsız test denemesi gerçekleştirilebilecek, 4 tek kullanımlık Epi proColon Bisülfıt Çözeltisi mevcuttur (ör. her biri 8 numune içeren 4 test).

Not: Kapaktan damlaları temizlemek ve/veya kalan sıvıyı toplamak için, bu talimatın birkaç adımında, mikrotüplerin kısa süreli santrifüjlenmesi gerekebilir ('Tüplerin dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın' şeklinde ifade edilmiştir). Tezgah üstü santrifüj kullanılarak, 10-20 saniye boyunca, 1.000 ± 150 rcf devir hızında santrifüj yapılması tavsiye edilir. Belirli adımlarda, manyetik boncukların sıkışmasını engellemek için, daha yüksek devirde santrifüj yapılmasından kaçının.

Not: Sıvının homojen olarak karışmasını sağlamak için, bu talimatın belirli adımlarında tüplerin ve kapların karıştırılması gereklidir. 5 ila 10 saniye orta hıza ayarlanmış bir girdaplayıcı kullanılması tavsiye edilir.

9.2.1 Plazma ve Epi proColon Pozitif ve Negatif Kontrolünün Eritilmesi

- Bir Epi proColon Pozitif Kontrol ve bir Epi proColon Negatif Kontrolünü, yaklaşık 30 dakika boyunca, 15 ila 30 °C arasında bir sıcaklıkta eritin.
- Dondurulmuş plazma numunesinin kullanılması durumunda, numuneyi, 30 dakika boyunca, 15 ila 30°C arasında bir sıcaklıkta eritin.
- Lizis, eritmeden sonra 60 dakika içerisinde başlatın.

9.2.2 Lizis

Not: Kullanmadan önce, Epi proColon Lizis Bağlama Tamponu hafifçe çalkalayın ve görsel olarak, çökeltileri kontrol edin. Çökeltilerin mevcut olması durumunda, Epi proColon Lizis Bağlama Tamponunu, 60 dakika boyunca 37°C'de su banyosu içerisinde ısıtın ve çökeltiler, tamamen çözülene kadar nazikçe çalkalayın. Epi proColon Lizis Bağlama Tamponunu kullanmadan önce, oda sıcaklığına getirin.

- Etiketli 15 ml santrifüj tüpüne, aşağıda belirtilenleri ekleyin:
 - 3,5 ml plazma örneği veya Epi proColon Pozitif Kontrol veya pi proColon Negatif Kontrol
 - 3,5 ml Epi proColon Lizis Bağlama Tamponu
- Tüpün kapağını kapatın ve 5-10 saniye girdaplayarak karıştırın
- Tüpü, tezgah üzerinde 15 ila 30°C arası sıcaklıkta 10 ± 1 dakika boyunca inkübe edin.

9.2.3 DNA Bağlanması

Not: Uygun test performansı için, Epi proColon Manyetik Boncukların homojen süspansiyonu gereklidir. Belirtilen boncuk miktarındaki sapmalar, yanlış sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. Doğru manyetik boncuk konsantrasyonunu sağlamak için, şişe, pipetlemeden hemen önce iyice karıştırılmalıdır. Şişe dibinde görünür çökelti olmamalıdır. Pipetleme işlemleri arasında homojen süspansiyon sağlamak için karıştırın.

- 15 ml santrifüj tüpüne, aşağıdakileri belirtilen sırayla ekleyin:
 - 90 µl Epi proColon Manyetik Boncuklar (yeni süspansiyon yapılmış)
 - 2,5 ml Mutlak Etanol (moleküler biyoloji için, $\geq 99,5$)
- Tüpün kapağını kapatın ve 5-6 kez döndürmek suretiyle karıştırın
- 15 ml tüpü, rotator içerisine yerleştirin.
- Ortalama hızda (yaklaşık 10 - 20 rpm hızında), 45 ± 5 dakika boyunca tüpü döndürün; rotator açısını 35 - 45 dereceye ayarlayın.

9.2.4 DNA Yıkama

Not: Yıkama işlemine başlamadan evvel, elüsyon ve bisülfıt dönüşüm adımlarında kullanılmak üzere ısıtıcı karıştırıcıyı, 80°C'ye ayarlayın.

- 15 ml tüpü, 5-10 dakika boyunca, DynaMag™-15 manyetik rafı içerisine yerleştirin.

Not: Bu aşama sonrasında tamamlanmamış boncuk yakalama gözlemlenmesi durumunda; tüpü, 10 dakikaya kadar 56°C'de inkübe edin (ör. su banyosu) ve tüpü, 5-10 dakika süresince DynaMag™-15 manyetik rafı içerisine geri yerleştirin.

- Manyetik boncuklarını almamaya dikkat ederek, üst tabakayı sıyırın
 - 1,5 ml Epi proColon Yıkama A Tamponu ekleyin
- 5-10 saniye süresince girdaplamak suretiyle, manyetik boncukları yeniden tamamen süspansiyon halinde tutun.
- Manyetik boncuk süspansiyonunu, ekstra uzun (22,5cm) tek kullanımlık bir aktarma pipeti kullanarak etiketlenmiş 2,0 ml mikrotüp içerisine aktarın.
- Kalan manyetik boncukları toplamak için, tek kullanımlık aktarma pipetini yeniden 15 ml tüpe yerleştirin ve 2,0 ml mikrotüp içerisine aktarın.
- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf içerisine yerleştirin.
- 15 cm boyunda tek kullanımlık aktarma pipeti kullanarak, mikrotüp halen DynaMag™-2 manyetik raf içerisindeyken, manyetik boncukları almamaya dikkat etmek suretiyle olabildiğince çok miktarda tamponu temizleyin.
- Tüplerin dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- 2,0 ml'lik mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf içerisine yerleştirin.
- 10 - 100 µl boyunda referans pipeti kullanarak, mikrotüp halen manyetik raf içerisindeyken, olabildiğince çok miktarda tamponu temizleyin.

9.2.5 Elüsyon

- Mikrotüpü, manyetik olmayan dişli çark içerisine aktarın.
- Epi proColon Elüsyon Tamponu, 5-10 saniye boyunca döndürün.
- Her mikrotüpe, 100 µl Epi proColon Elüsyon Tamponu ekleyin.
- Mikrotüpü kapatın.
- 5-10 saniye süresince girdaplamak suretiyle, manyetik boncukları yeniden süspansiyon halinde tutun.
- Mikrotüpü, 1,000 ± 100 rpm devir hızına ayarlanmış ısıtıcı karıştırıcı içerisine yerleştirin ve 80°C'de 10 ± 1 dakika boyunca inkübe edin.
- Tüplerin dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf içerisine yerleştirin.
- Mikrotüp halen manyetik raf içerisindeyken tüm eluatı (~100 µl DNA çözeltisi), yeni 2,0 ml mikrotüp içerisine aktarın.
- Manyetik boncukların bulunduğu 2 ml mikrotüpü ıskartaya çıkartın.

9.2.6 Çıkarılmış DNA'nın saklanması

Not: Ekstrakte edilmiş DNA'nın hemen kullanılmaması durumunda; malzemeyi, 2 ila 8°C arası sıcaklıkta 24 saat boyunca saklayın. Ekstrakte edilmiş DNA'yı dondurmayın.

9.2.7 Bisülfite Dönüşümü

Not: Epi proColon Bisülfite Çözeltisi, oksijenle temasa karşı hassastır. Sadece açılmamış Epi proColon Bisülfite Çözelti tüplerini kullanın. Kalan çözeltiyi saklamayın, bertaraf edin.

- Aşağıda belirtilen reaktifleri, içerisinde eluat bulunan 2,0 ml (~100 µl DNA çözeltisi) mikrotüplerin içerisine ekleyin:
 - 150 µl Epi proColon Bisülfite Çözeltisi
 - 25 µl Epi proColon Koruma Tamponu

Not: Epi proColon Koruma Tamponunun rengi, şeffaf ve kahverengiye yakın bir renk arasında değişiklik gösterebilir.

- Mikrotüp kapağını kapatın ve 5-10 saniye boyunca girdaplamak suretiyle, bisülfite reaksiyonunu karıştırın.
- Tüplerin dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.

- Mikrotüpü, ısıtıcı karıştırıcı içerisine yerleştirin ve 80°C'de 45 ±5 dakika boyunca karıştırmadan inkübe edin.
- 45 ± 5 dakika sonra, hemen mikrotüpü ısıtıcı karıştırıcıdan çıkartın.
- Isıtıcı karıştırıcının ısısını 23°C'ye ayarlayın veya daha sonra kullanılmak üzere, ikinci bir ısıtıcı karıştırıcıyı 23°C'ye ayarlayın.

9.2.8 Bağlanma Adımı

Not: Uygun performansı için, Epi proColon Manyetik Boncuk süspansiyon içerisindeki boncukların homojen süspansiyonu gereklidir. Belirtilen boncuk miktarındaki sapmalar, yanlış sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. Doğru manyetik boncuk konsantrasyonunu sağlamak için, şişe, pipetlemeden hemen önce iyice karıştırılmalıdır. Şişe dibinde görünür çökelti olmamalıdır. Pipetleme işlemleri arasında homojen süspansiyon sağlamak için karıştırın.

- Bisülfid reaksiyonu olan 2,0 ml mikrotüpün dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- Aşağıdaki bileşenleri, mikrotüpe ekleyin:
 - 1000 µl Epi proColon Yıkama A Tamponu
 - 20 pl Epi proColon Manyetik Boncuklar (yeni süspansiyon yapılmış)
- 5-10 saniye süresince girdaplamak suretiyle karıştırın.
- Isıtıcı karıştırıcı, 23°C'ye ulaşana kadar bekleyin.
- Mikrotüpü, 1000 ± 100 rpm devir hızına ayarlanmış ısıtıcı karıştırıcı içerisine yerleştirin ve 45 ± 5 dakika boyunca inkübe edin.
- Mikrotüpün dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik dişli raf üzerine yerleştirin.
- 15 cm boyunda yeni bir tek kullanımlık aktarma pipeti kullanarak, mikrotüp halen DynaMag™-2 manyetik raf içerisindeyken, manyetik boncukları almamaya dikkat etmek suretiyle olabildiğince çok miktarda sıvıyı temizleyin.

9.2.9 Birinci Yıkama

- Örneği, yıkama ve girdaplamak için, manyetikten çıkartın:
 - 800 µl Epi proColon Yıkama A Tamponu ekleyin.
- 5-10 saniye süresince girdaplayarak, yeniden süspanse edin.
- Mikrotüpün dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf üzerine yerleştirin.
- 15 cm boyunda yeni bir tek kullanımlık aktarma pipeti kullanarak, mikrotüp halen DynaMag™-2 manyetik raf içerisindeyken, manyetik boncukları almamaya dikkat etmek suretiyle olabildiğince çok miktarda sıvıyı temizleyin.

9.2.10 İkinci Yıkama

- Örneği, yıkama ve girdaplamak için, manyetikten çıkartın:
 - 800 µl Epi proColon Yıkama B Tamponu ekleyin.
- 5-10 saniye süresince girdaplayarak, yeniden süspanse edin.
- Mikrotüpün dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf üzerine yerleştirin.
- 15 cm boyunda yeni bir tek kullanımlık aktarma pipeti kullanarak, mikrotüp halen manyetik raf içerisindeyken, manyetik boncukları almamaya dikkat etmek suretiyle olabildiğince çok miktarda sıvıyı temizleyin.

9.2.11 Üçüncü Yıkama

- Örneği, yıkama ve girdaplamak için, manyetik raftan çıkartın:
 - 400 µl Epi proColon Yıkama B Tamponu ekleyin.
- 5-10 saniye süresince girdaplayarak, yeniden süspanse edin.
- Mikrotüpün dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.

- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf üzerine yerleştirin.
- 15 cm boyunda yeni bir tek kullanımlık aktarma pipeti kullanarak, mikrotüp halen manyetik raf içerisindeyken, manyetik boncukları almamaya dikkat etmek suretiyle olabildiğince çok miktarda sıvıyı temizleyin.
- Mikrotüpün dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf üzerine yerleştirin.
- 10 - 100 µl boyunda referans pipeti kullanarak, mikrotüp halen manyetik raf içerisindeyken, manyetik boncukları almamaya dikkat etmek suretiyle kalan sıvıyı temizleyin.

9.2.12 Kurutma

Not: Aşırı kurutma, bisDNA geri kazanımını azaltabileceği için, kurutma zamanını veya ısısını yükseltmeyin.

- Mikrotüpün kapağını açın.
- Mikrotüpü, ısıtıcılı karıştırıcı içerisine yerleştirin.
- Pelleti, 23°C'de 10 ± 1 dakika boyunca karıştırmadan kurutun.

9.2.13 Elüsyon

- Mikrotüpü, manyetik olmayan bir raf içerisine yerleştirin.
 - 60 µl Epi proColon Elüsyon Tamponu ekleyin.
- Mikrotüpün kapağını kapatın.
- 5-10 saniye süresince girdaplayarak, manyetik boncukları yeniden süspanse edin.
- Mikrotüpü, 1000 ± 100 rpm devir hızına ayarlanmış ısıtıcılı karıştırıcı içerisinde, 45 ± 5 dakika boyunca inkübe edin.
- Mikrotüpün dönüşünü, kısa süreliğine yavaşlatın.
- Mikrotüpü, 2-6 dakika süresince, DynaMag™-2 manyetik raf üzerine yerleştirin.
- 10 - 100 µl boyunda referans pipeti kullanarak, tüm eluatı (~ 60 µl DNA çözeltisi), 96 hazneli mikroparka içerisine yerleştirin ve yapışkan film uygulayıcı kullanarak, plakayı yapışkan filmle kapatın.
- bisDNA saklama plakasını, Tablo 4 dâhilinde tavsiye edilen plaka planına göre ayarlayın.

Tablo 4: Tavsiye edilen bisDNA Saklama Plakası Planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC [#]	S7										
B	NC ^{\$}	S8										
C	S1	S9										
D	S2	S10										
E	S3	S1										
F	S4	S12										
G	S5	S13										
H	S6	S14										

#Epi proColon Pozitif Kontrol, \$Epi proColon Negatif Kontrol

9.2.14. Bisülfid Dönüştürülmüş DNA'nın Saklanması

Ekstrakte edilmiş bisülfid dönüştürülmüş DNA'nın (bisDNA) hemen kullanılmaması durumunda; malzemeyi, 2 ila 8°C arası sıcaklıkta 24 saat veya -25 ila -15°C arası sıcaklıkta 72 saat boyunca saklayın.

9.3. PCR Ayarı

Not: Her bir bisDNA (hasta numunesi, Epi proColon Pozitif Kontrol veya Epi proColon Negatif Kontrol), üç tekrar halinde test edilmelidir.

Not: Kullanmadan önce kapakta kalan damlaları temizlemek için, tezgah üstü santrifüj kullanarak, 10-20 saniye boyunca, 1.000 ± 150 rcf devir hızında Epi proColon Polimerazı çalıştırın.

9.3.1 PCR Ana Karışımı Hazırlama

- Hastaların sayısına ve kontrol örneği belirlemelerine bağlı olarak, 1 veya 2 Epi proColon PCR Karışım tüplerini eritin (bkz. Tablo 5).
- Epi proColon PCR Karışım Tüpünü/Tüplerini, 5 ila 10 saniye boyunca girdaplayın, tüp/tüplerin dönüşünü kısa süreliğine yavaşlatın.
- Uygun miktarlardaki Epi proColon PCR Karışım ve Epi proColon Polymerazı, Tablo 5 dâhilinde belirtilen şekilde, 2,0 ml mikrotüpler içerisine aktarın.
- 5-10 saniye süresince girdaplayarak, PCR Ana Karışımını karıştırın.
- Kapakta kalan damlaları temizlemek için, tüplerin dönüşünü kısa süreliğine yavaşlatın.

Not: PCR Ana Karışımı hemen kullanın. Saklamayın. Kullandıktan sonra, kullanılmamış Epi proColon PCR Karışım ve Epi proColon Polimeraz'ı, yeniden dondurun.

Not: Tek bir PCR için, 16 µl Epi proColon PCR Karışım ve 0,8 µl Epi proColon Polymeraz gereklidir. Belirtilen miktarlara, pipetleme boşluğu dâhildir. Ana Karışımı hazırlamak için, ek bir reaksiyon hazırlamaya gerek yoktur.

Tablo 5: Pipetleme boşluğuyla PCR Ana Karışımı Hazırlama

Bileşen	8 Belirleme için Miktar (24 PCR)	16 Belirleme için Miktar (48 PCR)	24 Belirleme için Miktar (72 PCR)	32 Belirleme için Miktar (96 PCR)
Epi proColon PCR Karışım	384 µl	768 µl	1152 µl	1536 µl
Epi proColon Polimeraz	19,2 µl	38,4 µl	57,6 µl	76,8 µl

Tablo 6: Tavsiye Edilen PCR Plaka Planı

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC [#]	PC [#]	PC [#]	S7	S7	S7						
B	NC ^{\$}	NC ^{\$}	NC ^{\$}	S8	S8	S8						
C	S1	S1	S1	S9	S9	S9						
D	S2	S2	S2	S10	S10	S10						
E	S3	S3	S3	S11	S11	S11						
F	S4	S4	S4	S12	S12	S12						
G	S5	S5	S5	S13	S13	S13						
H	S6	S6	S6	S14	S14	S14						

#Epi proColon Pozitif Kontrol, \$Epi proColon Negatif Kontrol

Not: PCR'ın, Applied Biosystems 7500 Fast veya 7500 Fast Dx PCR Cihazlarıyla gerçekleştirilecek olması durumunda; 10. ve 13. bölümlerdeki talimatlara uyun.

PCR'ın, Roche LightCycler 480 Cihaz I'le gerçekleştirilecek olması durumunda; 11. ve 13. bölümlerdeki talimatlara uyun.

PCR'ın, Roche LightCycler 480 Cihaz II'yle gerçekleştirilecek olması durumunda; 12. ve 13. bölümlerdeki talimatlara uyun.

10. Applied Biosystems 7500 Fast ve 7500 Fast Dx PCR Cihazlarıyla Analiz

10.1. Yazılım Gereklilikleri

Bu ürün, 21 CFR Bölüm 11 Modüllü SDS v1.4 yazılımı kullanılarak onaylanmıştır.

10.2. PCR Plaka Hazırlama (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

- PCR plakasını ayarlayın. Tablo 6 dâhilinde belirtilen plaka planı tavsiye edilmektedir.
- 15 µl PCR Ana Karışımını, MicroAmp® Fast Optik 96 Hazneli Reaksiyon Plakasında bulunan seçilmiş haznelere aktarın.
- Gerekli görülmesi halinde, 9.2.13. bölümde oluşturulan bisDNA saklama plakasını, plaka santrifüjü kullanarak 1000 ± 100 rcf devir hızında 1 dakika boyunca hafifçe santrifüjleyin.
- PCR plakasının ilgili haznelerine, 15 µl bisDNA çözeltisi ekleyin.
- Plakayı, MicroAmp® Optik Yapıştırıcı Film kullanarak kapatın.
- Plaka dönüşünü, plaka santrifüjü kullanarak 1000 ± 100 rcf devir hızında 1 dakika boyunca yavaşlatın.

Not: Doldurulmuş PCR plakası, 2 ila 8 °C arasında 4 saate kadar buzdolabında saklanabilir.

10.3. Plaka Yükleme (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Not: PCR Ana Karışım içerisinde ROX veya diğer referans boyaları bulunmamaktadır. Bu nedenle, pasif referans ayarı, "yok" olarak ayarlanmalıdır.

Not: Tanımlanmış çevrim ve analiz ayarlarıyla bulunan şablon dosyanın (*.sdt) kaydedilmesi tavsiye edilir.

- Yazılımı çalıştırın.
- Belirlenmiş deney şablon dosyasını yükleyin veya yeni plaka belgesi oluşturun.
- "Create New Document"e basın.
- Aşağıdaki plaka belgesini tanımlayın:
 - Deney: Standart Eğri (Mutlak Miktar)
 - Kap: 96 Hazneli Plaka
 - Şablon: Boş Belge (veya ilgili Epi proColon 2.0 CE Şablon dosyasını seçin)
 - Çalıştırma Modu: Standart 7500.
- "Next" butonuna basın.
- "New Detector..." ibaresini seçin.
- Aşağıda belirtilen özellikleri kullanarak, yeni bir detektör oluşturun:
 - Adı: Septin9
 - Tanım: Epi proColon 2.0 CE
 - Haberci boya: FAM
 - Söndürücü boya: (yok)
 - Renk: Kırmızı.
- "Create Another" butonuna basın ve aşağıdaki özellikleri tanımlayın:
 - Adı: ACTB
 - Tanım: Epi proColon 2.0 CE
 - Haberci boya: JOE
 - Söndürücü boya: (yok)
 - Renk: Yeşil.
- "ok" butonuna basın.
- Her iki detektörü de seçin ve plaka belgesine detektör eklemek için "Add >>" butonuna basın.
- "Passive Reference" olarak açılan menüde, "(none)" seçeneğini seçin.

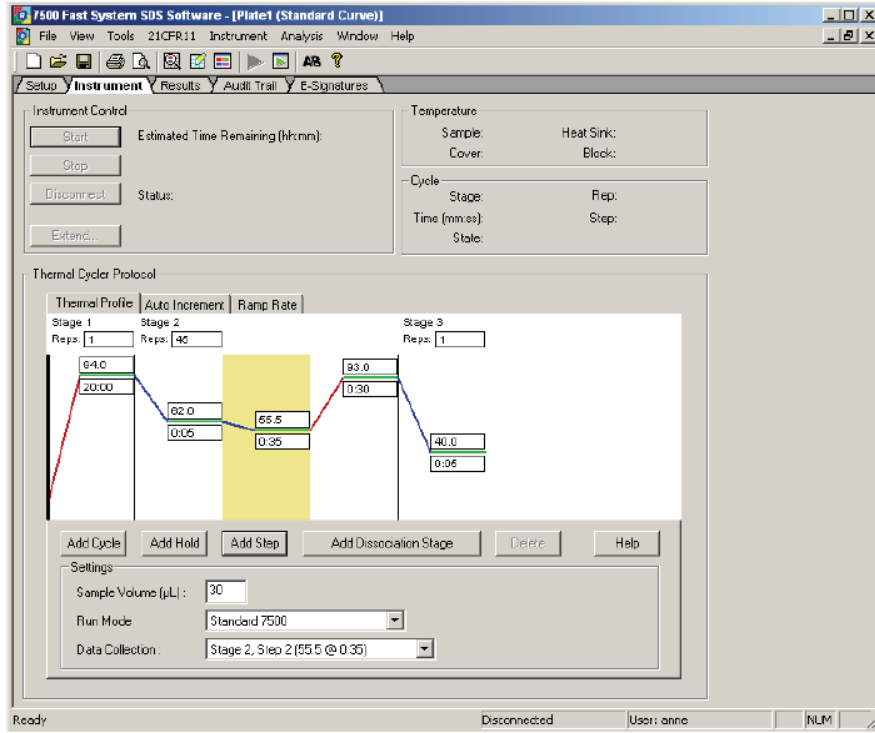
- "Done" butonuna basın.
- "Setup" ve "Plate" sekmesine gidin.
- Plakanın 96 haznesinin tamamını seçin.
- Menüye gidin ve "View" sekmesinden, "Well Inspector" açın.
- "Septin9" ve "ACTB" detektörlerini seçin.
- Pasif Referans ayarının "(none)" olduğundan emin olun (bkz. Şekil 1).
- "Close" butonuna basın.
- "Instrument" sekmesinden, Tablo 7 dâhilinde belirtilen şekilde çevrim koşullarını ayarlayın.
- Aşağıdaki ayarları değiştirin:
 - Numune Hacmi: 30 µl,
 - Çalışma Modu: Standart 7500,
 - Veri Toplama Aşama 2, Adım 2.
- 3 aşamadan oluşan "Thermal Profile" oluşturun.
- Üç adımdan oluşan "Aşama 2" ve bir adımdan oluşan "Aşama 1" ve "Aşama 3" oluşturun.
- Tablo 7'ye göre, tekrarlamaları, hedef sıcaklığı ve bekleme süresini girin.
- Tablo 7'ye göre "Ramp Rate" değiştirin.
- "Aşama 2, Adım 2 (55.5 @ 0:35)" için "Veri Toplama"yı ayarlayın.
- Tablo 7'ye göre, Isıtıcı Çevrim Protokol ayarlarını onaylayın (bk. Şekil 2).
- Çalıştırma plaka belgesini, uygun bir dosya adıyla kaydedin. Tekneyi açın.
- PCR plakayı, çerçeveye yerleştirin (A1 konumu, üst sol köşeye gelmelidir), plakanın çerçeveye tam oturduğundan emin olun. Tekneyi kapatın.
- "Start" butonuna basarak, çalıştırın.

Tablo 7: Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx için Isıtıcı Çevrim Programı

Program Parametresi	Denatürasyon		Çevrim		Bekleme
Aşama	"Aşama 1"		"Aşama 2"		"Aşama 3"
Tekrarlamalar	1		45		1
Adım	1	1	2	3	1
Hedef [°C]	94	62	55,5	93	40
Bekleme [mm:ss]	20:00	00:05	00:35	00:30	00:05
Otomatik Artma		0	0	0	
Eğim Oranı (%):	40	80	80	40	80
Veri toplama	Faz 2, Aşama 2 (55.5 @ 0:35)				



Şekil 1: 'Well Inspector' penceresindeki ayarlar onaylandıktan sonraki ekran görüntüsü..



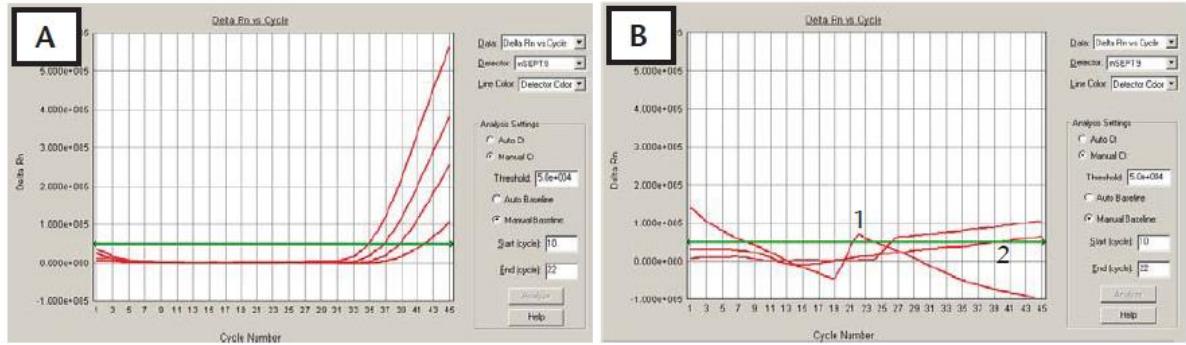
Şekil 2: Çevrim programı ve belirleme modu seçildikten sonraki ekran görüntüsü.

10.4. Analiz Ayarları (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Not: PCR denemelerini, yalnızca yazılım sürüm SDS v1.4 veya yazılım sürüm SDS v1.4.1 ile analiz edin.

- **Not:** Tamamlanmamış denemeler veya hata mesajı alınan denemeler, analiz edilmelidir. Deneme belgesinde, mutlaka 45 çevrim için floresan verisi olmalıdır. PCR çevrim programını tamamladıktan sonra, "ok" butonuna basın.
- "Results" sekmesini ve sonra "Amplification Plot" sekmesini seçin.
- Septin 9 detektörü için, "Analysis Setting" aşağıdaki gibi olacak şekilde seçin:
 - Veri: "Delta Rn vs Cycle"
 - Detektör: "Septin9"
 - Çizgi Rengi: "Detektör Rengi"
 - Manuel Döngü Eşiği, Eşik: "50000" ("5.0e+004" şeklinde görülür)
 - Manuel taban çizgisi, Başlangıç (çevrim): "10"
 - Manuel taban çizgisi, Bitiş (çevrim): "22"
- ACTB detektörü için, "Analysis Setting" aşağıdaki gibi olacak şekilde seçin:
 - Veri: "Delta Rn vs Cycle"
 - Detektör: "ACTB"
 - Çizgi Rengi: "Detektör Rengi"
 - Manuel Döngü Eşiği, Eşik: "25000" ("2.5e+004" şeklinde görülür)
 - Kılavuz taban çizgisi, Başlangıç (çevrim): "10"
 - Kılavuz taban çizgisi, Bitiş (çevrim): "22"
- "Analyze" butonuna basın.
- "Save" butonuna basın.
- Septin 9 Döngü eşiği değerleri ve ACTB Döngü eşiği değerleri otomatik olarak hesaplanır.
- Analiz edilecek olan hazneleri seçin.
- Yükseltme eğrileri, "Amplification Plot" sekmesinde gösterilir.
- Döngü eşiği değerleri, "Report" sekmesinde gösterilir.

Not: Her yükseltme eğrisi gözle görülmelidir. Tutarsız veriler nedeniyle eşik değerini aşan yükseltme eğrileri (gürültü dorukları) veya düz eğri şekli, negatif olarak değerlendirilmelidir. Şekil 3'te örnekler sunulmuştur.



Şekil 3: Applied Biosystems 7500 Fast kullanılarak elde edilmiş Septin 9 yükseltme eğrilerinin ekran görüntüsü.

A: Geçerli pozitif eğri örnekleri. B: Tutarsız veri noktaları (1) veya düz eğri şekli (2) nedeniyle negatif eğri örnekleri.

10.5 Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerliliği (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Kontrol başına **HER ÜÇ (3)** PCR tekrarlama için Tablo 8 dâhilinde gösterilen kriterlerin karşılanması durumunda, Epi proColon Pozitif Kontrol ve Epi proColon Negatif Kontrol ile birlikte işlenen bir veya daha fazla hastanın numune/numunelerinin çalıştırılması geçerli sayılır.

Epi proColon Pozitif Kontrol veya Epi proColon Negatif Kontrol'den herhangi birinin veya her ikisinin birden geçersiz sayılması durumunda; kontrollerle işlenmiş hasta numuneleri için veriler yorumlanamaz. Bu test denemesi içerisine dâhil olan tüm hasta numuneleri için test tekrarlanmalıdır.

Tablo 8: Applied Biosystems 7500 Fast ve 7500 Fast Dx ile analiz edilmiş Epi proColon Kontrollerinin Geçerlilik Sınırlamaları

Kontrol Sonucu	Saptama	Septin 9 Sonucu	ACTB Sonucu
Geçerli Pozitif Kontrol	PCR1	$Ct^* \leq 41,1$	$Ct^* \leq 29,8$
	PCR2	$Ct^* \leq 41,1$	$Ct^* \leq 29,8$
	PCR3	$Ct^* \leq 41,1$	$Ct^* \leq 29,8$
Geçerli Negatif kontrol	PCR1	Ct^* sağlanamamıştır	$Ct^* \leq 37,2$
	PCR2	("Undetermined")	$Ct^* \leq 37,2$
	PCR3		$Ct^* \leq 37,2$

*Döngü Eşiği

10.6. Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Tek PCR için yorumlama, Tablo 9 uyarınca yapılır. Dâhili kontrol denemesi ACTB'nin sonuçlarının; tek PCR (ACTB döngü eşiği, Tablo 9'da tanımlanmıştır) içerisinde yeterli bisDNA girdisi olduğunu göstermesi durumunda, Septin 9 PCR sonuçları, tek PCR için sonuçları tanımlar (bkz. 13. bölüm). Tablo 9 dâhilinde belirtilen döngü eşiğinin yukarıdaki ACTB değeri, tek PCR sonucunun "Geçersiz PCR" olduğunu gösterir.

Tablo 9: Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Tek PCR Sonuçları	Septin 9 Sonucu	ACTB Sonucu
Septin 9 Pozitif	$Ct^* < 45$	$Ct^* \leq 32,1$
Septin 9 Negatif	Ct^* sağlanamamıştır ("Undetermined")	$Ct^* \leq 32,1$
Geçersiz	herhangi bir sonuç	$Ct^* > 32,1$ Veya "Undetermined"

*Döngü Eşiği

11. Roche LightCycler 480 Cihazı I ile Analiz

11.1. Plaka Hazırlama (LightCycler 480 Cihaz I)

- PCR plakasını ayarlayın. Tablo 6 dâhilinde belirtilen plaka planı tavsiye edilmektedir.
- 15 µl PCR Ana Karışımı, LightCycler 480 Çok Hazneli Plaka 96 Reaksiyon Plakası içerisine aktarın.
- 9.2.13. bölümde oluşturulan bisDNA saklama plakasını, plaka santrifüjü kullanarak 1000 ± 100 rcf devir hızında 1 dakika boyunca hafifçe santrifüjleyin.
- PCR plakasının ilgili haznelerine, 15 µl bisDNA çözeltisi ekleyin.
- LightCycler 480 Kapatma Folyosu ile PCR plakasını kapatın.
- PCR plaka dönüşünü, plaka santrifüjü kullanarak 1000 ± 100 rcf devir hızında 1 dakika boyunca yavaşlatın.

Not: Doldurulmuş PCR plakası, 4 saate kadar 2 ila 8°C arasında saklanabilir.

11.2. Plaka Yükleme (LightCycler 480 Cihaz I)

Not: Tanımlanmış çevrim ve analiz ayarlarıyla bulunan şablon dosyanın (*.ixo) kaydedilmesi tavsiye edilir.

- Yazılım sürümü 1.5.x'i çalıştırın.
- "New Experiment" butonuna basarak, yeni bir deney oluşturun:
- Belirtilen deney şablon dosyasını yükleyin veya aşağıdaki Tablo 10 dâhilinde belirlenen PCR program parametre detaylarına göre, aşağıdaki deneyi tanımlayın.
- Tekneyi açın.
- PCR plakayı, çerçeveye yerleştirin (A1 konumu, üst sol köşeye gelmelidir), plakanın çerçeveye tam oturduğundan emin olun. Tekneyi kapatın.
- Başlamak için, "Start Run"a basın.

Tablo 10: LightCycler 480 Cihaz I için Standart PCR Programı

Program Parametresi	Denatürasyon		Çevrim		Soğutma
Analiz Modu	Yok		Miktar modu		Yok
Devirler	1		50		1
Segment	1	1	2	3	1
Hedef [°C]	94	62	56	93	40
Bekleme [mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Eğim Oranı [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Edinim Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok

* LightCycler 480 Cihaz I: belirleme formatı olarak "Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe" seçin; filtre kombinasyonu 483 - 533 nm ve 523 - 568 nm seçin ve "Reaction Volume", "30" olarak ayarlayın.

11.3. Analiz Ayarları (LightCycler 480 Cihaz I)

Not: LightCycler 480 Cihaz I kullanıcıları, Renk Dengelemeyi "ON" olarak ayarlamalı ve "Filter Comb 483 - 533" ve "Filter Comb 523 - 568" filtre kombinasyonları için ilgili "Epi proColon Color Compensation" dosyasını yüklemeliler.

Not: LightCycler 480 Cihaz I'nin kullanım kılavuzunda belirtilen ilgili numune alt kümesini oluşturarak, yalnızca kullanılmış hazneler üzerine veri analizi gerçekleştirin.

- "Analysis Overview" penceresini açarak, LightCycler 480 Temel Yazılım Modül çubuğu üzerindeki "Analysis" butonunu seçin.
- Tüm numuneler için "Abs Quant/Fit Points" seçin.
- "Epi proColon Color Compensation" etkinleştirin.

- "Filter Comb 483 - 533" etkinleştirin.
- "First Cycle" olarak "1" ve "Last Cycle" olarak "50" seçin.
- "Cycle Range" penceresinde, "Min Offset" olarak "4" ve "Max Offset" olarak "21" seçerek, arkaplanı (mavi arkaplan butonuna basın), "5-22" olarak ayarlayın.
- Gürültü bandını, "Noise Band (Fluoresc)" olarak ayarlayın ve "Noise Band" penceresinden, manuel olarak gürültü bandını "1,6" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde "Threshold (Manual)" seçtikten sonra, eşiği "1,6" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde, Uyum Noktalarını "2" olarak ayarlayın.
- "Calculate" butonuna basın.

Her bir numune için **Septin 9 Kesişme Noktaları ("CP")** otomatik olarak hesaplanır ve Numune Tablosunda gösterilir.

- Numune Tablosunda, farenin sağ tuşuna basarak, CP değerlerini dışarıya aktarın. "Export" butonunu seçin. Dosyayı, özgün ve anlamlı bir isimle kaydedin.
- "Filter Comb 523 - 568" etkinleştirin.
- "First Cycle" olarak "1" ve "Last Cycle" olarak "50" seçin.
- "Cycle Range" penceresinde, "Min Offset" olarak "4" ve "Max Offset" olarak "21" seçerek, arkaplanı (mavi arkaplan butonuna basın), "5-22" olarak ayarlayın.
- Gürültü bandını, "Noise Band (Fluoresc)" olarak ayarlayın ve "Noise Band" penceresinden, manuel olarak gürültü bandını "0,8" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde "Threshold (Manual)" seçtikten sonra, eşiği "0,8" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde, Uyum Noktalarını "2" olarak ayarlayın.
- "Calculate" butonuna basın.

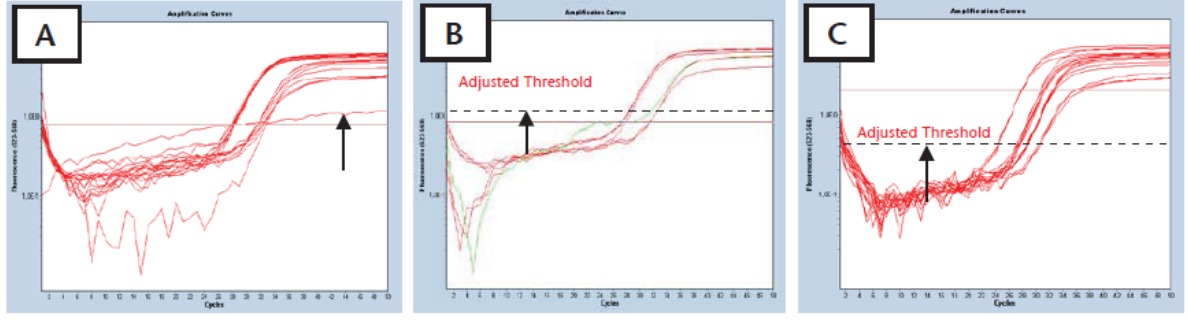
Her bir numune için **ACTB CP değerleri** otomatik olarak hesaplanır ve Numune Tablosunda gösterilir.

- Numune Tablosunda, farenin sağ tuşuna basarak, CP değerlerini dışarıya aktarın. "Export" butonunu seçin. Dosyayı, özgün ve anlamlı bir isimle kaydedin.

Not: "Gürültü Bandı" ve "Eşik" seçimini, arkaplanın çok az üzerinde olacak ve üstel artışın başlangıcında yükseltme eğrilerini geçecek şekilde ayarlayın. Anlamlı üstel artış gözlemlenmeyen yükseltme eğrileri negatif olarak değerlendirilmelidir.

11.4. Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerliliği (LightCycler 480 Cihaz I)

Kontrol başına **HER ÜÇ (3)** PCR tekrarlama için Tablo 11 dâhilinde gösterilen kriterlerin karşılanması durumunda, Epi proColon Pozitif Kontrol ve Epi proColon Negatif Kontrol ile birlikte işlenen hasta numunelerinin çalıştırılması geçerli sayılır.



Şekil 4: LightCycler 480 kullanılarak elde edilmiş Septin 9 yükseltme eğrilerinin ekran görüntüsü. A: Anlamalı üstel artış gözlemlenmeyen yükseltme eğrisi negatif olarak değerlendirilmelidir. B: Eşik, arkaplanın biraz üzerinde olacak şekilde ayarlanmalıdır. C: "Eşik", üstel artışın başlangıcında yükseltme eğrilerini geçecek şekilde ayarlanmalıdır.

Epi proColon Pozitif Kontrol veya Epi proColon Negatif Kontrol'den herhangi birinin (veya her ikisinin birden) geçersiz sayılması durumunda; kontrollerle işlenmiş hasta numuneleri için veriler yorumlanamaz. Bu test çalışması içerisine dâhil olan tüm hasta numuneleri için test tekrarlanmalıdır.

Tablo 11: Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerlilik Sınırları (LightCycler 480 Cihaz I).

Kontrol Sonucu	Saptama	Septin 9 Sonucu	ACTB Sonucu
Geçerli Pozitif Kontrol	PCR1	$CP^* \leq 40,6$	$CP^* \leq 29,5$
	PCR2	$CP^* \leq 40,6$	$CP^* \leq 29,5$
	PCR3	$CP^* \leq 40,6$	$CP^* \leq 29,5$
Geçerli Negatif kontrol	PCR1	CP^* sağlanamamıştır	$CP^* \leq 36,5$
	PCR2		$CP^* \leq 36,5$
	PCR3		$CP^* \leq 36,5$

*Kesişme Noktası

11.5. Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (LightCycler 480 Cihaz I)

Dâhili kontrol denemesi ACTB'nin sonuçlarının; tek PCR (ACTB döngü eşiği, Tablo 9'da tanımlanmıştır) içerisinde yeterli DNA girdisi olduğunu göstermesi durumunda, Septin 12 PCR sonuçları, tek PCR için sonuçları tanımlar (bkz. 13. bölüm). Tablo 12 dâhilinde belirtilen kesişme noktasının yukarıdaki ACTB değeri, tek PCR sonucunun "Geçersiz" olduğunu gösterir.

Tablo 12: Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (LightCycler 480 Cihaz I)

Tek PCR Sonuçları	Septin 9 Sonucu	ACTB Sonucu
Septin 9 Pozitif	$CP^* < 50$	$CP^* \leq 33,1$
Septin 9 Negatif	CP^* sağlanamamıştır	$CP^* \leq 33,1$
Geçersiz	herhangi bir sonuç	$CP^* \leq 33,1$

*Kesişme Noktası

12. Roche LightCycler 480 Cihazı II ile Analiz

12.1. Plaka Hazırlama (LightCycler 480 Cihaz II)

- PCR plakasını ayarlayın. Tablo 6 dâhilinde belirtilen plaka planı tavsiye edilmektedir.
- 15 µl PCR Ana Karışımı, LightCycler 480 Çok Hazneli Plaka 96 Reaksiyon Plakası içerisine aktarın.
- 9.2.13. bölümde oluşturulan bisDNA saklama plakasını , plaka santrifüjü kullanarak 1000 ± 100 rcf devir hızında 1 dakika boyunca hafifçe santrifüjleyin.
- PCR plakasının ilgili haznelerine, 15 µl bisDNA çözeltisi ekleyin.
- LightCycler 480 Kapatma Folyosu ile PCR plakasını kapatın.
- PCR plaka dönüşünü, plaka santrifüjü kullanarak 1000 ± 100 rcf devir hızında 1 dakika boyunca yavaşlatın.

Not: Doldurulmuş PCR plakası, 2 ila 8 °C arasında 4 saate kadar buzdolabında saklanabilir.

12.2. Plaka Yükleme (LightCycler 480 Cihaz II)

Not: Tanımlanmış çevrim ve analiz ayarlarıyla bulunan şablon dosyanın (*.ixo) kaydedilmesi tavsiye edilir.

- Yazılım sürümü 1.5.x'i çalıştırın.
- "New Experiment" butonuna basarak, yeni bir deney oluşturun:
- Belirtilen deney şablon dosyasını yükleyin veya aşağıdaki Tablo 13 dâhilinde belirlenen PCR program parametre detaylarına göre, aşağıdaki deneyi tanımlayın.
- Tekneyi açın.
- PCR plakayı, çerçeveye yerleştirin (A1 konumu, üst sol köşeye gelmelidir), plakanın çerçeveye tam oturduğundan emin olun. Tekneyi kapatın.
- Başlamak için, "Start Run"a basın.

Tablo 13: LightCycler 480 Cihaz II için Standart PCR Programı

Program Parametresi	Denatürasyon		Çevrim		Soğutma
Analiz Modu	Yok		Miktar modu		Yok
Devirler	1		50		1
Segment	1	1	2	3	1
Hedef [°C]	94	62	56	93	40
Bekleme [mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Eğim Oranı [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Edinim Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok

* LightCycler 480 Cihaz II: belirleme formatı olarak "Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe" seçin; filtre kombinasyonu 465 - 510 nm ve 533 - 580 nm seçin ve "Reaction Volume", "30" olarak ayarlayın.

12.3. Analiz Ayarları (LightCycler 480 Cihaz II)

Not: LightCycler 480 Cihaz II'nin kullanım kılavuzunda belirtilen ilgili numune alt kümesini oluşturarak, yalnızca kullanılmış hazneler üzerine veri analizi gerçekleştirin.

- "Analysis Overview" penceresini açarak, LightCycler 480 Temel Yazılım Modül çubuğu üzerindeki "Analysis" butonunu seçin.
- Tüm numuneler için "Abs Quant/Fit Points" seçin.
- "Filter Comb 465 - 510" etkinleştirin.
- "First Cycle" olarak "1" ve "Last Cycle" olarak "50" seçin.

- "Cycle Range" penceresinde, "Min Offset" olarak "4" ve "Max Offset" olarak "21" seçerek, arkaplanı (mavi arkaplan butonuna basın), "5-22" olarak ayarlayın.
- Gürültü bandını, "Noise Band (Fluoresc)" olarak ayarlayın ve "Noise Band" penceresinden, manuel olarak gürültü bandını "2,0" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde "Threshold (Manual)" seçtikten sonra, eşiği "2,0" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde, Uyum Noktalarını "2" olarak ayarlayın.
- "Calculate" butonuna basın.

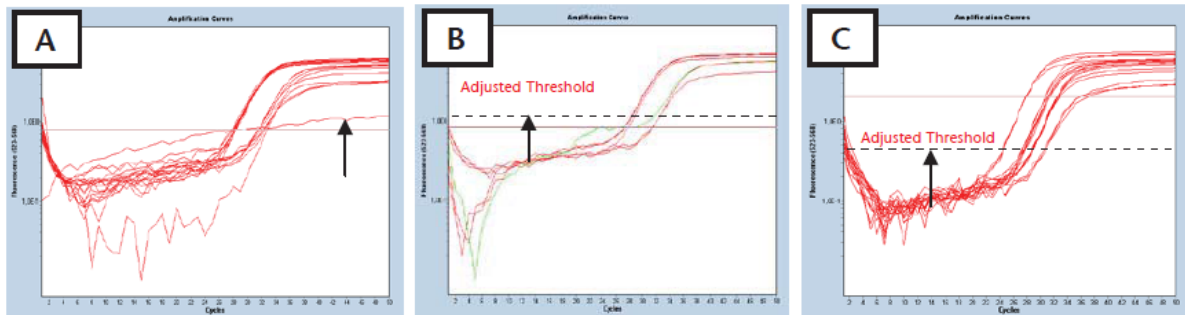
Her bir numune için **Septin 9 Kesişme Noktaları ("CP")** otomatik olarak hesaplanır ve Numune Tablosunda gösterilir.

- Numune Tablosunda, farenin sağ tuşuna basarak, CP değerlerini dışarıya aktarın. "Export" butonunu seçin. Dosyayı, özgün ve anlamlı bir isimle kaydedin.
- "Filter Comb 533 - 580" etkinleştirin.
- "First Cycle" olarak "1" ve "Last Cycle" olarak "50" seçin.
- "Cycle Range" penceresinde, "Min Offset" olarak "4" ve "Max Offset" olarak "21" seçerek, arkaplanı (mavi arkaplan butonuna basın), "5-22" olarak ayarlayın.
- Gürültü bandını, "Noise Band (Fluoresc)" olarak ayarlayın ve "Noise Band" penceresinden, manuel olarak gürültü bandını "2,0" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde "Threshold (Manual)" seçtikten sonra, eşiği "2,0" olarak ayarlayın.
- "Analysis" penceresinde, Uyum Noktalarını "2" olarak ayarlayın.
- "Calculate" butonuna basın.

Her bir numune için **ACTB CP değerleri** otomatik olarak hesaplanır ve Numune Tablosunda gösterilir.

- Numune Tablosunda, farenin sağ tuşuna basarak, CP değerlerini dışarıya aktarın. "Export" butonunu seçin. Dosyayı, özgün ve anlamlı bir isimle kaydedin.

Not: "Gürültü Bandı" ve "Eşik" seçimini, arkaplanın çok az üzerinde olacak ve üstel artışın başlangıcında yükseltme eğrilerini geçecek şekilde ayarlayın. Anlamlı üstel artış gözlemlenmeyen yükseltme eğrileri negatif olarak değerlendirilmelidir.



Şekil 5: LightCycler 480 kullanılarak elde edilmiş Septin 9 yükseltme eğrilerinin ekran görüntüsü. A: Anlamlı üstel artış gözlemlenmeyen yükseltme eğrisi negatif olarak değerlendirilmelidir. B: Eşik, arkaplanın biraz üzerinde olacak şekilde ayarlanmalıdır. C: "Eşik", üstel artışın başlangıcında yükseltme eğrilerini geçecek şekilde ayarlanmalıdır.

12.4. Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerliliği (LightCycler 480 Cihaz II)

Kontrol başına **HER ÜÇ (3)** PCR tekrarlama için Tablo 14 dâhilinde gösterilen kriterlerin karşılanması durumunda, Epi proColon Pozitif Kontrol ve Epi proColon Negatif Kontrol ile birlikte işlenen hasta numunelerinin çalıştırılması geçerli sayılır.

Epi proColon Pozitif Kontrol veya Epi proColon Negatif Kontrol'den herhangi birinin (veya her ikisinin birden) geçersiz sayılması durumunda; kontrollerle işlenmiş hasta numuneleri için veriler yorumlanamaz. Bu test çalışması içerisine dâhil olan tüm hasta numuneleri için test tekrarlanmalıdır.

Tablo 14: Epi proColon Kontrolleriyle Çalışma Geçerlilik Sınırları (LightCycler 480 Cihaz I).

Kontrol Sonucu	Saptama	Septin 9 Sonucu	ACTB Sonucu
Geçerli Pozitif Kontrol	PCR1	$CP^* \leq 40,5$	$CP^* \leq 30,3$
	PCR2	$CP^* \leq 40,5$	$CP^* \leq 30,3$
	PCR3	$CP^* \leq 40,5$	$CP^* \leq 30,3$
Geçerli Negatif kontrol	PCR1	CP* sağlanamamıştır	$CP^* \leq 37,1$
	PCR2		$CP^* \leq 37,1$
	PCR3		$CP^* \leq 37,1$

*Kesişme Noktası

12.5. Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (LightCycler 480 Cihaz II)

Dâhili kontrol denemesi ACTB'nin sonuçlarının; tek PCR (ACTB döngü eşiği, Tablo 9'da tanımlanmıştır) içerisinde yeterli DNA girdisi olduğunu göstermesi durumunda, Septin 15 PCR sonuçları, tek PCR için sonuçları tanımlar (bkz. 13. bölüm). Tablo 15 dâhilinde belirtilen kesişme noktasının yukarıdaki ACTB değeri, tek PCR sonucunun "Geçersiz PCR" olduğunu gösterir.

Tablo 15: Tek PCR için Sonuçların Yorumlanması (LightCycler 480 Cihaz II)

Tek PCR Sonuçları	Septin 9 Sonucu	ACTB Sonucu
Septin 9 Pozitif	$CP^* < 50$	$CP^* \leq 33,7$
Septin 9 Negatif	CP* sağlanamamıştır	$CP^* \leq 33,7$
Geçersiz	herhangi bir sonuç	$CP^* \leq 33,7$

*Kesişme Noktası

13. Hasta Örneği için Sonuçların Yorumlanması

Bir hasta numunesi için test sonuçları, Tablo 16 uyarınca yorumlanır. Üç PCR tekrarlarından ikisinin, Septin 9 Pozitif olması durumunda, hasta numunesi için test sonuçları "POZİTİF" kabul edilir. Üç PCR tekrarlarından ikisinin, Septin 9 Negatif olması durumunda, hasta numunesi için test sonuçları "NEGATİF" kabul edilir. Diğer tüm durumlarda, test sonucu "GEÇERSİZ" kabul edilir.

Tablo 16: Epi proColon 2.0 CE Test Sonuçlarının Yorumlanması

Test Sonucu	Pozitif Kontrol, Negatif Kontrol.	Tek PCR Sonuçları
POZİTİF	Geçerli	En az iki Pozitif Septin 9
NEGATİF	Geçerli	En az iki Negatif Septin 9
GEÇERSİZ	Geçerli	Diğer tüm durumlar
GEÇERSİZ	Geçersiz	yok

4. Kalite Kontrol

14.1. Harici Kontroller

Epi proColon 2.0 CE, Epi proColon Pozitif ve Negatif Kontrolleri (M5-02-003) kapsar. Bu kontroller, test sonuçlarının geçerliliğini sağlamak için, iş akışının başarılı gerçekleştirildiğinin takibi için, her bir çalıştırma esnasında kullanılmalıdır. Epi proColon Pozitif ve Negatif Kontrol değerleri, geçerlilik sınırları içerisinde olmalıdır (bkz. Tablo 8 veya Tablo 11 veya Tablo 14). Bir kontrolün, belirlenmiş aralık dışında olması durumunda; ilgili test sonuçları geçersizdir ve raporlanmamalı, test tekrarlanmalıdır.

Laboratuvar kalite kontrol prosedürlerinin, test sonuçlarını doğrulamak için daha sık kontrol kullanımına ihtiyaç olması durumunda, bu prosedürleri uygulayın.

14.2. Dâhili Kontroller

Dâhili kontrol, bisülfid dönüştürülmüş ACTB (β -aktin) DNA'nın saptanmasını sağlar. Bu güçlendirilmiş dâhili kontrol, numune kalitesini, numune hazırlamayı ve numune içerisindeki yeterli DNA konsantrasyonunu kontrol eder.

Septin 9 PCR sonuçları, ACTB PCR'ın Ct veya Cp değeriyle bağlantılıdır (bkz. Tablo 9 veya Tablo 12 veya Tablo 15). Yüksek değerlerin, çok düşük bisDNA içeriği veya PCR inhibisyonu ile bağlantılı olması nedeniyle; ACTB PCR'ın belirlenmiş aralık dışındaki Ct veya Cp değerleri, tek PCR sonucunu geçersiz kılar.

15. Prosedürün Kısıtlamaları

- Yalnızca *in vitro* tanısal kullanım amaçlıdır.
- Bu ürün, Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001), Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon Kiti (M5-02-002) ve Epi proColon Kontrol Kiti (M5-02-003) kombinasyonu için onaylanmıştır. Parçalar, diğer DNA ekstraksiyon yöntemi veya PCR kiti ile değiştirilmemelidir.
- Bu ürün, BD Vacutainer® K₂EDTA, S-Monovette® 9 ml Potasyum-EDTA ve S-Monovette® 8,5 ml CPDA tüpleriyle alınan kandan elde edilen plazmayla kullanım için tasarlanmıştır. Diğer numune türleri veya diğer kan alma tüpleriyle kullanım için uygun değildir.
- Kanın, 25 °C'den yüksek sıcaklıklarda S-Monovette® 8,5 ml CPDA tüpleri içerisinde saklanması; yanlış pozitif test sonuçlarına neden olabilir.
- Bu ürün, PCR deneyleri için deneyimli ve eğitimli personelin kullanımı içindir.
- Kolorektal kanserin saptanması, numune içerisinde dolaşan tümör DNA miktarına bağlıdır ve numune alma yöntemlerine, numune saklanması, hasta faktörlerine (yaş, diğer hastalıklar) ve tümör evresinden etkilenebilir.
- Sonuçlar, kolorektal kanserin varlığı veya yokluğu için doğrulayıcı kanıt sunmamaktadır. Pozitif Epi proColon 2.0 CE test sonucu, kolonoskopi veya sigmoidoskopi vasıtasıyla doğrulanmalıdır.
- Klinik olarak kronik gastrit, özofajit, seronegatif romatoid artrit, akciğer kanseri, meme kanseri ve prostat kanseri taşıması konulan hastalarda, pozitif test sonuçları gözlemlenmiştir.
- Hamile kadınlarda pozitif sonuçlar gözlemlenmiştir.
- Epi proColon 2.0 CE test sonucu, diğer klinik parametrelerle birlikte değerlendirilmelidir.

16. Performans Özellikleri

16.1. Analitik Hassasiyet

Analitik hassasiyet, 168 Septin 9 saptamasıyla sonuçlanan, 0, 6, 12, 18, 25, 35 ve 50 pg/ml konsantrasyonlarında HeLa DNA (Septin 9 pozitif) numunelerle 2 x 7 teknik Tespit Sınırı (LoD) olan 4 bağımsız çalıştırma gerçekleştiren 3 uygulayıcı tarafından değerlendirilmiştir. SDS v1.4 ile Applied Biosystems 7500 Fast Dx üzerinde yapılan tüm saptamalar geçerli sayılmıştır. HeLa DNA bulunan 144 LoD numunesinin 133'ü pozitif ve HeLa DNA bulunmayan 24 numunenin 24'ü negatiftir. Tahmini LoD₉₅, Epi proColon 2.0 CE için 14 pg/ml (CI %95; 9 pg/ml - 19 pg/ml) olan bir lojistik regresyon modeli tarafından belirlenmiştir.

Benzer bir araştırma ayarı, LightCycler 480 Cihaz I kullanılarak analitik hassasiyetin belirlenmesinde kullanılmıştır. Tahmini LoD₉₅ değeri, eşdeğer olarak bulunmuştur.

16.2. Yeniden üretilebilirlik

Bu prosedürün yeniden üretilebilirliği, insan EDTA plazmasından elde edilen dokuz havuzdaki plazma parçalarının işlenmesiyle test edilmiştir. Plazma havuzlarının altısı, kolorektal karsinoma teşhisi bulunan hastalardan elde edilmiş plazmadır. Üç havuz, mevcutta herhangi bir hastalığı olmayan hastalardan elde edilen plazmalardan oluşmaktadır. Tüm havuzlar, üç uygulayıcı tarafından, Epi proColon Plazma Hızlı Kiti (M5-02-001) ve Epi proColon Hassas Polimeraz Zincir Reaksiyon Kiti (M5-02-002) kullanılarak 6 tekrarda işlenmiştir. 54 Septin 9 saptamasının 54'ünden beklenen sonuç (kansere havuzu, Septin 9 pozitif; kanser olmayan havuz, Septin 9 negatif), uygun olarak elde edilmiştir.

16.3. Klinik Duyarlılık ve Özgüllük

Epi proColon 2.0 CE'nin klinik performansı, hastalık belirtisi bulunmayan, ortalama riski grubundan geleceğe yönelik olarak toplanmış 149 klinik numuneden ve tüm evrelerde kolorektal karsinoma olduğu histolojik olarak kanıtlanmış vaka kontrollü deneyden 197 klinik numuneden ve hastalık belirtisi olmayan, negatif olduğu kolonoskopiyle doğrulanmış numunelerle belirlenmiştir.

Bisülfıt dönüştürülmüş DNA, Vacutainer® K₂EDTA Tüpleriyle (Becton Dickinson) kan alımından sonraki dört saat içerisinde işlenmiş kandan elde edilen plazmadan hazırlanmıştır. Geçerli Septin 9 ölçümleri, 346 numunenin, 346'sından elde edilmiştir (%100).

Geleceğe yönelik toplanmış kohort çalışmada, 149 numuneden 1'inden pozitif test sonuçları elde edilmiştir. Bu grup dâhilindeki tahmini yanlış pozitif oranı, %1'dir (CI %95: %0 - %4). Bu sayılar, %99 klinik özgüllük olarak değerlendirilmektedir (CI %95: %96-%100).

Hastalık belirtisi olmayan vaka kontrol kohort çalışmasından 99 denekten (kontrol grubu) elde edilen 96 numunenin, Septin 9 negatif olduğunun gözlemlenmesi; tahmini klinik özelliğın, %97 olmasına neden olmaktadır (CI %95; %91 - % 99), Tablo 17'ye bakınız.

Kolorektal karsinoma teşhisi bulunan 98 denekten 79 numunenin Septin 9 pozitif olduğunun gözlemlenmesi; tahmini klinik özelliğın %81 olduğunu göstermektedir (CI %95: %72 - % 87). Erken lokalize kolorektal kanser vakalarında, Epi proColon 2.0 CE testi, 56 hastanın 43'ünde (18 evre I, 25 evre II) pozitifdir (%77).

Aşağıdaki tablo, elde edilen verileri özetler.

Tablo 17. Epi proColon 2.0 CE'nin klinik performans verilerinin özeti

	Kontroller (tarama kohortlu)	Kontroller (vaka kontrollü)	Tüm kolorektal karsinomalar	Lokalize kolorektal karsinomalar
Geçerli sonuçlar	149	99	98	56
Septin 9 Pozitif	1	3	79	43
Septin 9 Negatif	148	96	19	13
Pozitiflik	%1	%3	%81	%77

16.4. İki Gerçek Zamanlı PCR cihazının Uyumu

Epi proColon 2.0 CE'nin Applied Biosystems 7500 Fast Dx System ve LightCycler 480 Cihaz I üzerindeki uyumu, tüm evrelerde kolorektal karsinoma olduğu histolojik olarak kanıtlanmış hastalardan alınan 48 plazma örneğı ve kolonoskopiyle doğrulanmış, belirgin kolon hastalığı bulunmayan hastalardan alınmış 52 numunenin yan yana ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir. Her iki ölçüm sisteminden, vakaların %93'ünde (93/100), uygun Septin 9 sonuçları elde edilmiştir.

16.5. İnterferans

Yüksek metillenmemiş genomik DNA (100 ng/ml), Bilirubin (0,20 mg/ml), Hemoglobın (1 mg/ml), Trigliseritler (12 mg/ml), Protein (insan serumundan elde edilmiş Albumin) (120 mg/ml), Kırmızı Kan Hücreleri (%0,4 v/v), K₂EDTA (20 mg/ml), Kolesterol (5 mg/ml), Urik asit (0,235 mg/ml) ve Glukoz (10 mg/ml) değerleri ve deney kontrol grubu, test edilen reaktif olmayan ve reaktif olan numuneler arasında interferans saptanmamıştır.

17. Sembollerin Anlamları

	Kullanım Talimatlarına başvurun
	Katalog Numarası
	<i>In vitro</i> Tanı Tıbbi Cihazı
	Parti kodu
	Son kullanma tarihi
	Üretici
	Sıcaklık Limiti
	Test Sayısı
	Yeniden Kullanmayın.
	UDI Barkodu
	Yalnızca ABD ile sınırlıdır: Dikkat: Federal kanun, bu cihazın satışının sadece yetkili doktorlar tarafından veya yetkili doktor siparişiyle yapılabileceğini belirtir.

18. Kaynakça

- 1 deVos, T et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. Clinical Chemistry 55:7, 1337-46 (2009)
- 2 Lofton-Day, C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. Clinical Chemistry 54:2, 414-423 (2008)
- 3 Model, F. et al. Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. Mol Cancer Res 5, 153-163 (2007)
- 4 Eads, C.A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Research, Volume 28, Issue 8, e32 (2000)

19. İletişim Bilgileri

Epi proColon 2.0 CE,

Epigenomics AG

Geneststr. 5

10829 Berlin, Almanya tarafından üretilmiştir.

Daha detaylı bilgi ve destek için, aşağıdaki adrese elektronik posta gönderin veya aşağıdaki numaraları arayın.

support@products.epigenomics.com

Phone: +49 30 24345 222

Fax: +49 30 24345 555

Alıcıya notlar

Epi proColon (Epi proColon®), Epigenomics AG'nin tescilli bir ticari markasıdır. Burada belirtilen diğer tüm ticari markalar, markalar ve isimler, sahibinin mülkiyetindedir. LightCycler® 480 System, F. Hoffman-La Roche Ltd.'nin tescilli ticari markasıdır.

Applied Biosystems® ve MicroAmp®, Life Technologies Corporation'ın tescilli ticari markalarıdır; DynaMag™, Life Technologies Corporation'ın ticari markasıdır.

FAM™, JOE™ ve TAMRA™, Applied Biosystems Corporation'ın tescilli ticari markasıdır.

BD Vacutainer®, Becton Dickinson Inc./Corporation'ın tescilli bir ticari markasıdır.

S-Monovette®, Sarstedt AG & Co.'nun tescilli bir ticari markasıdır.

ThermoMixer®, Research®, Reference®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S.®, Combitips advanced®, Eppendorf AG'nin tescilli ticari markasıdır; Safe Lock™, Eppendorf AG'nin ticari markasıdır. HandyStep®, Brand GmbH + Co KG'nin tescilli bir ticari markasıdır.

Bu ürünün satın alınması, belirli Roche patentleri uyarınca, alıcıya, yalnızca insanlarda in vitro tanı hizmeti sunmak için kullanma hakkını verir. Satın alım sonucu, genel patent veya bu kullanım amacı dışındaki herhangi bir türde diğer lisans verilmemektedir.