



# Plasma-SeqSensei™

## Breast Cancer IVD Kit

Kullanım Talimatları














Aralık 2023

ZR150547.R3

tr

**REF** ZR150544

## İN VİTRO TEST/In vitro teşhis için

<b>Simgeler Sözlüğü</b>			
	Üretici		Kullanacak olan
	Katalog numarası		Lot numarası
	<n> sayıda test için yeterli içerik		Dikkat
	Sıcaklık sınırı		Kullanım talimatlarına başvurun
	İn vitro teşhis		Tekrar kullanmayın
	Işıktan uzak tutun		Kuru tutun
	Nem sınırı		

## İçindekiler

1	Kullanım amacı.....	3
2	Giriş.....	4
3	Test prensibi.....	5
4	Kapsam dahilindeki bölgeler .....	7
5	Varyant sonucu yorumlama .....	8
6	Sınırlamalar .....	9
7	Reaktifler, sarf malzemeleri ve teçhizat .....	10
7.1	Sağlanan materyal.....	11
7.2	Sağlanmayan materyaller .....	13
7.3	Sarf malzemeleri.....	14
7.4	Teçhizat .....	14
8	Saklama ve kullanım .....	16
8.1	Nakliye koşulları .....	16
8.2	Genel kullanım önlemleri .....	16
8.3	Uyarılar ve önlemler .....	16
8.3.1	Özel tedbirler .....	17
8.3.2	Kullanım ve saklama .....	17
8.3.3	Reaktiflere ilişkin kullanım önlemleri .....	18
8.3.4	Güvenlik ve kontaminasyon önlemleri.....	18
9	İş akışı .....	21
9.1	UID PCR (Multipleks PCR) .....	22
9.2	UID PCR pürifikasyonu .....	27
9.3	İndeks PCR .....	31
9.4	İndeks PCR pürifikasyonu.....	36
9.5	Kütüphane KK (Bioanalyzer).....	40
9.6	Illumina NextSeq™ 500/550'de dizileme .....	44
10	Teknik destek .....	48
11	Performans özellikleri.....	49
11.1	Analitik duyarlılık.....	49
11.2	Analitik spesifiklik .....	49
11.3	Keskinlik/tekrarlanabilirlik .....	49
11.4	Ölçüm aralığı/doğrusallık .....	50
11.5	Enterferans maddeleri .....	50
11.6	Klinik performans ve karakteristik özellikler .....	50
11.7	Sınırlamalar .....	51
12	Sözlük ve terimler dizgesi .....	52
13	Referanslar .....	54
14	Telif hakları ve ticari markalar.....	55
15	Revizyon geçmişi.....	56

### 1 Kullanım amacı

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, kanser hastalarının kan plazmasından izole edilen insan dolaşımındaki hücresiz DNA'da (cfDNA) bulunan AKT1, ERBB2, ESR1, KRAS, PIK3CA ve TP53 hedef genlerindeki mutasyonların saptanması ve tanımlanmasına yönelik kantitatif bir next-generation sequencing (NGS), yani yeni nesil dizileme testi olup minimal rezidüel hastalığın saptanması, nüks takibi ve hastalarda (neo-)adjuvan yanıt izleme amaçlarıyla kullanılır.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, kullanım amacına ulaşılabilmesi için yalnızca Plasma-SeqSensei™ IVD Software ile birlikte kullanılmalı ve uygulama, eğitimli personel tarafından profesyonel bir laboratuvar ortamında yapılmalıdır. Edinilen bilgi, tıbbi kararların alınmasında asla tek belirleyici olmamalıdır.

**Not:** *Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit ürününün taramada, kanser teşhisinde veya teşhis yardımcısı olarak kullanılması amaçlanmamıştır.*

## 2 Giriş

Meme kanseri en sık teşhis edilen kanser türü olup kansere bağlı kadın ölümlerinin dünya çapındaki en büyük nedenidir (1). Son yıllarda küratif cerrahi, (neo-)adjuvan tedavi ve hedefe yönelik tedavilere ilişkin kapsamlı araştırmalar yapılmış, bu sayede sağkalım oranı artmıştır (2).

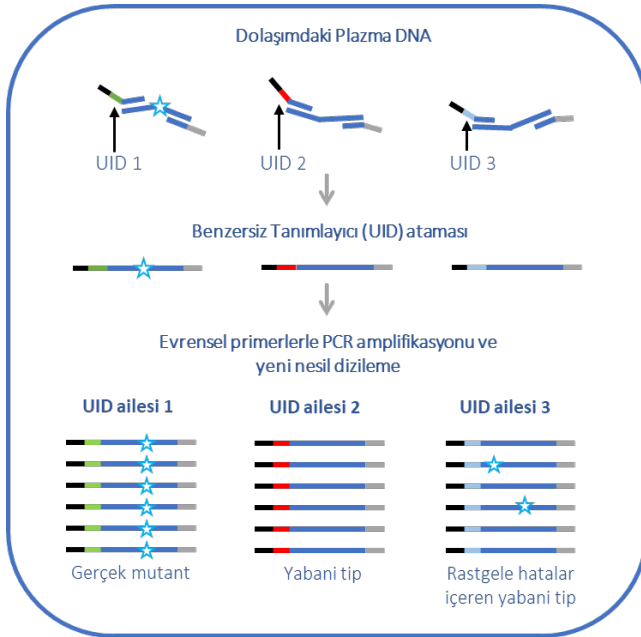
Apoptoz, nekroz veya metabolik sekresyon geçiren tümör hücreleri, DNA'larının küçük bir kısmını kan dolaşımına salar. cfDNA'nın tümöre özgü fraksiyonu, dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) olarak adlandırılmakta olup primer tümör ve hatta metastazlara ilişkin genetik bilgiler içerir. Çok sayıda araştırma çalışması ve deney; tedavi seçimi, prognoz ve izlemeyi de kapsayan farklı kanser tedavisi aşamalarında ctDNA profillemenin klinik uygulamasını ortaya koymuştur (3).

ctDNA tespitine yönelik NGS tabanlı çeşitli teknolojiler mevcuttur. Ancak dizileme ve PCR yanlışlığı/hataları nedeniyle bunların çoğu nadir varyantların tespiti için uygun değildir. Plasma-SeqSensei™, dizileme iş akışında benzersiz moleküler tanımlayıcılar (UID) kullanan NGS tabanlı yeni bir teknolojidir. Plasma-SeqSensei™ teknolojisi ultra yüksek hassasiyete sahip olduğundan hataları önemli ölçüde azaltır (4).

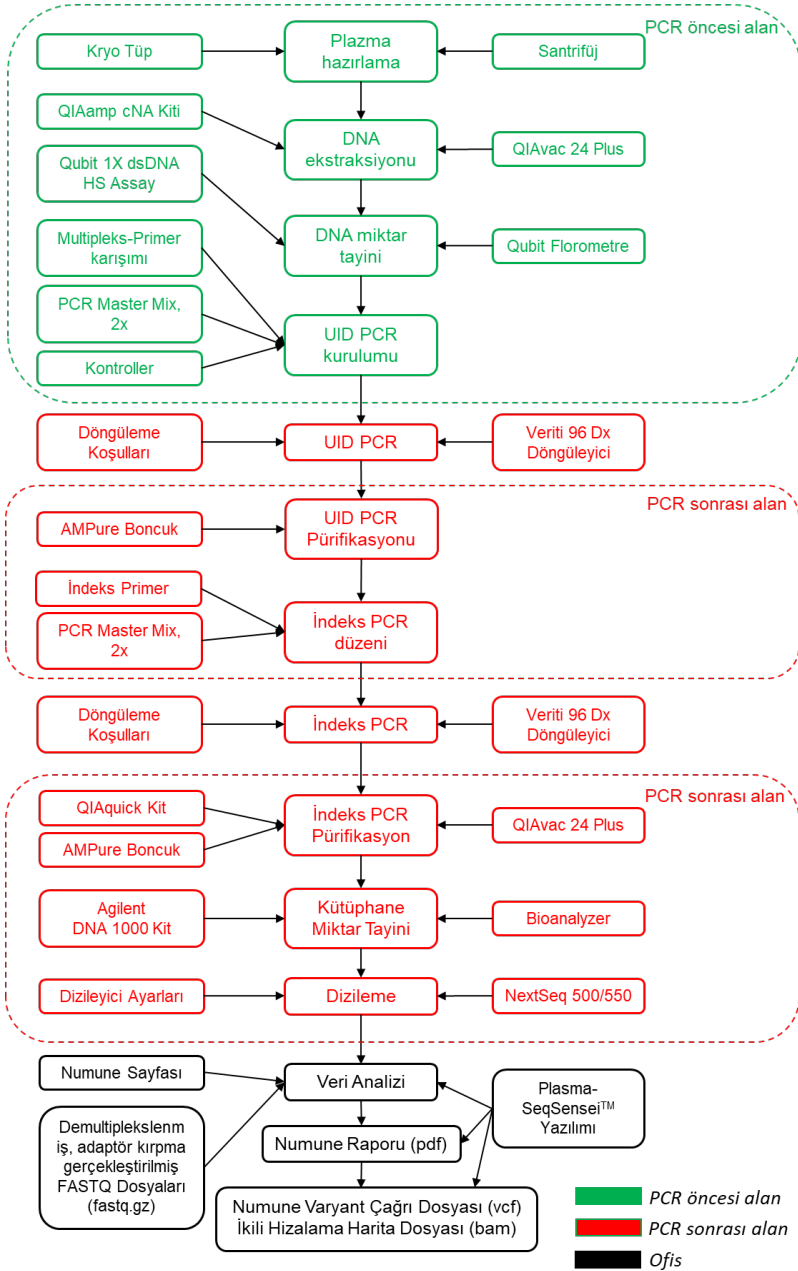
## 3 Test prensibi

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, kan plazmasından izole edilen ctDNA'daki gen mutasyonlarını tespit eder. Yöntemin hassasiyetini artırmak üzere DNA parçaları, ilk amplifikasyon adımı esnasında UID'ler kullanılarak etiketlenir. Böylece atanan her bir UID'nin çeşitli kopyalarından oluşan UID aileleri oluşması sağlanır. İkinci amplifikasyon adımı esnasında bir UID ailesinin her bir üyesine, hazne ve plakaya özgü ilave bir barkod atanır (4). Geçerlilik sağlama amacıyla her çalışmada harici pozitif ve negatif kontrollere ilaveten dahili miktar tayini girdi kontrolü de (Quantispik) eklenir.

İş akışı, Plasma-SeqSensei™ IVD software ile otomatik veri analizi ve rapor oluşturmayı kapsar. Yazılım, cfDNA girdisini nicel hale getirerek içindeki tüm PCR parçalarının en az % 90'ının özdeş mutasyonları kapsadığı UID aileleri olan süpermutantları tanımlar. Bu konsept sayesinde gerçek mutantlar, yalnızca çok az sayıda UID aile üyesinde bulunan PCR ve dizileme artefaktlarından ayırt edilmiş olur. Plasma-SeqSensei™ teknolojisine ilişkin temel işlem, Şekil 1 üzerinde görülebilir.



**Şekil 1: Plasma-SeqSensei™ teknolojisine ilişkin prensip**



Şekil 2: Plasma-SeqSensei™ yöntemine ilişkin iş akışına genel bakış

## 4 Kapsam dahilindeki bölgeler

**Tablo 1: Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit kapsamındaki bölgeler**

Gen	Transkript*	Kodlama dizisi başlangıcı	Kodlama dizisi sonu	Amino asit başlangıcı	Amino asit sonu
AKT1	ENST00000554581.1	47	69	17	23
ERBB2	ENST00000269571.5	907	947	303	315
ERBB2	ENST00000269571.5	2.258	2.307	754	769
ERBB2	ENST00000269571.5	2.308	2.360	770	786
ESR1	ENST00000440973.1	1.108	1.143	370	381
ESR1	ENST00000440973.1	1.378	1.420	460	473
ESR1	ENST00000440973.1	1.583	1.614	529	538
KRAS	ENST00000256078.4	8	43	4	14
PIK3CA	ENST00000263967.3	254	278	86	92
PIK3CA	ENST00000263967.3	329	352	111	117
PIK3CA	ENST00000263967.3	353	367	119	122
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.033	1.058	345	352
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.085	1.115	363	371
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.252	1.264	418	421
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.348	1.387	450	462
PIK3CA	ENST00000263967.3	1.611	1.659	538	553
PIK3CA	ENST00000263967.3	2.138	2.184	714	728
PIK3CA	ENST00000263967.3	3.118	3.169	1.040	1.056
TP53	ENST00000269305.4	144	232	49	77
TP53	ENST00000269305.4	293	375	99	125
TP53	ENST00000269305.4	376	423	126	141
TP53	ENST00000269305.4	451	537	151	179
TP53	ENST00000269305.4	574	659	192	219
TP53	ENST00000269305.4	695	782	233	260
TP53	ENST00000269305.4	783	856	262	285
TP53	ENST00000269305.4	888	919	297	306
TP53	ENST00000269305.4	920	993	308	331
TP53	ENST00000269305.4	994	1.080	332	360

\* Dizi kaynağı: Topluluk veri tabanı



### 5 Varyant sonucu yorumlama

Test, plazma kaynaklı ctDNA'daki somatik mutasyonların tespiti için tasarlanmıştır. Siparişte bulunan doktorun çalışmasında tamamlayıcı işlev görebileceğinden bu testin sonuçları, nitelikli bir sağlık uzmanı tarafından klinik bulgular, tümör patolojisi ve diğer laboratuvar verileri bağlamında yorumlanmalıdır.

#### Mutasyon sıklıkları:

Mutasyon sıklıkları hem MAF (mutant alel fraksiyonu) hem de mutlak MM (mutant molekül) sayısı olarak raporlanır. MAF, toplam cfDNA'ya göre mutant ctDNA oranıdır. MAF, mutasyon varlığı veya yokluğunu doğrulamakta kullanılabilir. Bununla birlikte bir numunedeki toplam cfDNA'ya göre ctDNA oranı; tümörün anatomik konumu, tümör hücresi döngüsü, vaskülarite, tedavi, kan numunesi alma prosedürleri, numune işleme ve hastanın tümör durumuyla ilgili olmayan klinik özellikleri gibi çeşitli faktörlerden etkilenebileceğinden MAF, genel tümör yükünü yansıtmayabilir (5). Belirli bir varyant için tespit edilen mutlak MM sayısı, bir numunede saptanan toplam molekül sayısını temsil eder ve hastaya özgü tümör biyolojisi özellikleri hakkında doğrudan bilgi sağlayabilir (5)(6).

#### Bildirilen varyantlar:

Karakterize, olası veya öngörülen işlevsel etkiye sahip varyantlar bildirilir. Bunlar, COSMIC gibi kamuya açık veri tabanlarına (7) ve/veya hakemli bilimsel literatüre dayalıdır (6)(8)(9). Ayrıca % 40 ila % 60 arasında gözlenen bir MAF tarafından işaret edilip germ hattı kaynaklı olduğundan şüphelenilen varyantlar ile % 90'dan fazla gözlenen MAF, rapor içinde ayrı bir tabloda gösterilir.

### 6 Sınırlamalar

Şüpheli germ hattı mutasyonları, gözlemlenen MAF değerlerine dayalı olarak somatik mutasyon bildirimine dahil edilmez. Eşleşen sağlıklı hücrelerin analizi olmaksızın bu mutasyonların germ hattı kökenli olup olmadığı test tarafından kesin olarak belirlenemiyor olsa da bunlar ayrı bir tabloda listelenmiş ve potansiyel germ hattı mutasyonları olarak işaretlenmiştir.

Ayrıca belirli genler için bildirilen mutasyonlar, hastaların küçük bir alt kümesinde klonal hematopoezin bir sonucu olabileceğinden bu konu, eşleşen kan hücrelerinin analizi yoluyla karara bağlanmalıdır.

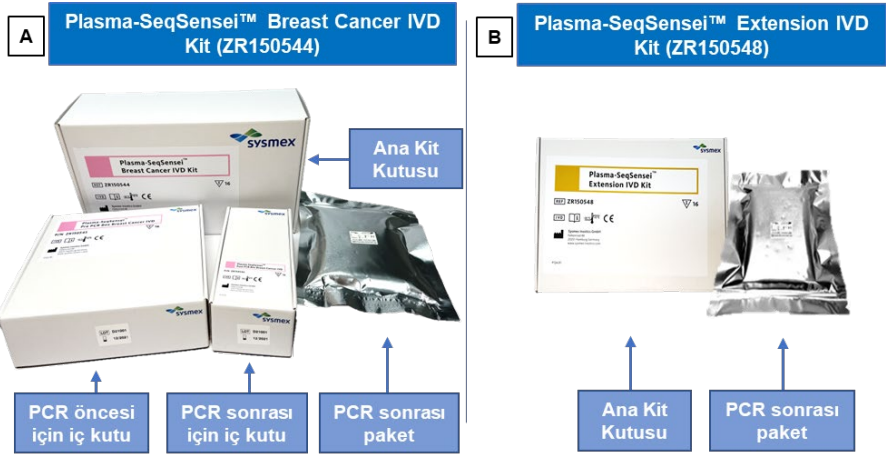
ctDNA'nın saptanabilirliği; tümör yükü, tümör biyolojisi, numune toplama koşulları, numune heterojenliği ve klinik özellikler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Özellikle hedef molekül sayıları eşik değerler civarında olan numunelerde testin, dizi bağlamına dayalı olarak düşük ancak tespit edilebilir varyasyonlar gösterdiği görülmüştür.

Bu test, nükleotid değişimlerini saptar ve sonuç olarak ortaya çıkan amino asit değişimleri raporda belirtilir. Amino asit kodlayan nükleotid üçlülerinin (amplikon sınırları) yalnızca kısmen kapsanması durumunda rapordaki amino asit açıklaması, testin kapsamadığı bazların referans diziye karşılık geldiği varsayımına dayanılarak yapılır.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, şu somatik mutasyon türlerini tespit etmek üzere test edilmiştir: tek nükleotid varyasyonları (SNV'ler), insersiyonlar (27 nükleotide kadar), delesyonlar (48 nükleotide kadar) ve delesyon/insersiyon varyantları (17 nükleotide kadar).

## 7 Reaktifler, sarf malzemeleri ve teçhizat

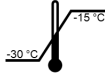
Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, iki iç kutu ve bir paket içerir. Kutulardan biri PCR öncesi laboratuvarında, diğer kutu ise Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate'i içeren paketle birlikte PCR sonrası laboratuvarında saklanmalıdır. Reaktif kontaminasyonu riskinin en aza indirilmesi için Kit kutusunun varır varmaz iki laboratuvar arasında dağıtılması önemle tavsiye edilir. PCR öncesi kutunun, amplifiye edilmiş DNA işlenmeyen bir laboratuvarında kullanılması amaçlanmıştır. PCR sonrası kutu ve paketin, PCR reaksiyon flakonları/plakalarının açılıp işlendiği bir laboratuvarında kullanılması amaçlanmıştır.



**Şekil 3: Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit kutuları ve paketi (A) ile Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit kutu ve paketi (B), ilgili saklama yerleriyle birlikte (PCR öncesi ve sonrası alanlar) gösterilmiştir.**

### 7.1 Sağlanan materyal

Sağlanan materyal tahlil için elzemdir ve başka ürünlerle değiştirilemez.



Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, kullanılmadığında -15 °C ile -30 °C arasında bir sıcaklıkta saklanmalıdır.

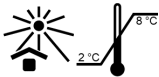


Açılmalarının ardından reaktifler, 30 gün boyunca veya son kullanma tarihlerine kadar (su hariç), hangisi önce geliyorsa, stabil kalır.

**Tablo 2: Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit (ZR150544) ile birlikte verilen materyal**

Kutu	Adı* (kapak rengi)	Kat No.	Tüpler	Dondurma- çözülme döngüleri	Saklama sıcaklıkları
PCR öncesi kutu	Breast Cancer Mpx A (mavi)	ZR851013	4	2	-15 °C ila -30 °C
	Breast Cancer Mpx B (sarı)	ZR851014	4	2	-15 °C ila -30 °C
	Breast Cancer Positive Control (kırmızı)	ZR855006	4	2	-15 °C ila -30 °C
	No Template Control (şeffaf)	ZR854002	4	2	-15 °C ila -30 °C
	Quantispike (yeşil)	ZR856001	4	2	-15 °C ila -30 °C
	PCR Master Mix v2, 2x (siyah)	ZR850001	4	4	-15 °C ila -30 °C
PCR sonrası paket	Index Primer Plate IND34 <sup>1,2</sup>	ZR852004	1	Yok	-15 °C ila -30 °C
PCR sonrası kutu	PCR Master Mix v2, 2x (siyah)	ZR850001	2	4	-15 °C ila -30 °C
	Su, nükleazsız (şeffaf/beyaz)	ZR224006	1	Yok	-15 °C ila -30 °C

\* Adlar, kit lotuna bağlı olarak adın önüne PSS eklenmesiyle farklılık gösterebilir.



<sup>1</sup> Plakaları ışığa maruz kalmaya karşı koruyun. İlk kullanımdan sonra Index Primer Plate'i, 2 °C ile 8 °C arasında bir sıcaklıkta saklayın.

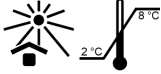
<sup>2</sup> Index Primer Plate IND34 hem iş akışında hem de Plasma-SeqSensei™ IVD Software'inde Plate A (Plaka A) olarak adlandırılır.

Aynı dizileme çalıştırmasında 16'dan fazla numunenin analiz edilmesi durumunda bir Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit sipariş edilmelidir.

**Tablo 3: Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit (ZR150548) ile birlikte verilen materyal**

Kutu	Adı (kapak rengi)	Kat No.	Tüpler	Dondurma-çözülme döngüleri	Saklama sıcaklıkları
PCR sonrası paket	Index Primer Plate IND35 <sup>1,2</sup>	ZR852005	1	Yok	-15 °C ila -30 °C

\* Adlar, kit lotuna bağlı olarak adın önüne PSS eklenmesiyle farklılık gösterebilir.



<sup>1</sup> Plakaları ışığa maruz kalmaya karşı koruyun. İlk kullanımdan sonra Index Primer Plate'i, 2 °C ile 8 °C arasında bir sıcaklıkta saklayın.

<sup>2</sup> Index Primer Plate IND35 hem iş akışında hem de Plasma-SeqSensei™ IVD Software'inde Plate B (Plaka B) olarak adlandırılır.

**Tablo 4: Sağlanan materyalin bileşimi**

Adı	Bileşim
Breast Cancer Mpx A	Primerler Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Mpx B	Primerler Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Positive Control	Çift sarmallı sentetik DNA yabani tip/mutant Tris EDTA Buffer Taşıyıcı RNA
No Template Control	Tris EDTA Buffer
Quantispike	Çift sarmallı sentetik DNA Tris EDTA Buffer Taşıyıcı RNA
Index Primer Plate	İndeks primerleri (hazneye özüğü) Bromofenol mavisi
PCR Master Mix v2, 2x	Hot-Start Polymerase PCR Buffer dNTP'ler
Su, nükleazsız	Nükleaz içermeyen su, moleküler biyoloji sınıfı



Kitin tüm sıvı ve kuru bileşenleri yalnızca tek kullanımlıktır. Her bir Index Primer Plate haznesi yalnızca tek kullanımlıktır.

Reaktif içeren tüpler, belirtilen iş akışı adımları için sıvı ekstrakte etmek üzere Tablo 2 uyarınca çözdürülüp dondurulabildiklerinden çok kullanımlık reaktiflerdir.

### 7.2 Sağlanmayan materyaller

Tablo 5, Tablo 6 ve Tablo 7 içinde üretici/satıcı ve sipariş numarası ayrıntılarının verildiği ürünler tahlil için zorunlu olup benzer kalite ve/veya özelliklere sahip ürünlerle değiştirilmemelidir.

**Tablo 5: Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit'le birlikte verilmeyen materyal**

Materyal	Ürün
Reaktifler ve kitler	Etanol (EtOH) ≥ % 99,8, p.a.
	Ribonükleaz ve deoksiribonükleaz içermeyen distile su
	* Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, #A63881
	* Buffer EB (Elüsyon Buffer'ı), QIAGEN, #19086
	* QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN, #28104 veya #28106
	* Buffer PB, QIAGEN, #19066
	* DNA 1000 Kit, Agilent, #5067-1504 <ul style="list-style-type: none"><li>■ Mikroakışkan çipler</li><li>■ Reaktifler</li></ul>
	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, #Q33230 (100 rxn) veya #Q33231 (500 rxn)
	Sodyum hidroksit (NaOH), 1 M
	Trizma® hidroklorür solüsyonu pH 7,0, 1 M
	* NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 döngü), Illumina, #20024904 Kit parçaları: <ul style="list-style-type: none"><li>■ Mid Output Reagent kartuş (150 döngü), #15057940</li><li>■ Mid Output Flow Cell kartuş, #20022409</li><li>■ Buffer kartuşu, #15057941</li><li>■ Hybridization Buffer (HT1), #15058251</li></ul>
	* NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 döngü), Illumina, #20024907 Kit parçaları: <ul style="list-style-type: none"><li>■ High Output Reagent kartuş (150 döngü), #15057931</li><li>■ High Output Flow Cell kartuş, #20022408</li><li>■ Buffer kartuşu, #15057941</li><li>■ Hybridization Buffer (HT1), #15058251</li></ul>

\* Zorunlu bileşenler; karşılaştırılabilir kalite ve/veya özelliklere sahip ürünlerle değiştirilmemelidir.

### 7.3 Sarf malzemeleri

**Tablo 6: Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit için gerekli sarf malzemeleri**

Laboratuvar teçhizatı	Ürün
Pipet uçları/serolojik pipetler	2, 10, 20, 200, 1.000 µl aerosole dayanıklı, filtrelili steril pipet uçları
Reaksiyon tüpleri	15, 5, 2, 1,5 ml'lik tüpler
	* LoBind® DNA tüpleri 1,5 ml, Eppendorf, #0030108051
	* Qubit™ Tahlil Tüpleri, Thermo Fisher, #Q32856
	Tüp şeritleri ve kapakları (1,3 ml)
96 hazneli plakalar	* PCR Plaka, 96 hazneli, segmente, yarım etekli, Thermo Scientific, #AB0900 veya #AB2400 (PCR için gerekli)
	96 hazneli Multiply® PCR plaka, yan eteksiz, Sarstedt (opsiyonel, yalnızca dilüsyonlar için)
96 hazneli plakalar için sızdırmazlık folyosu	Alüminyum folyo
	Şeffaf yapışkan film
Güvenlik teçhizatı	Koruyucu ceketler, kolluklar, gözlükler, tek kullanımlık galoşlar, eldivenler
Muhtelif	Tek kullanımlık reaktif rezervuarları (25 ml)
	* QIAvac vakum manifoldları için 3 ml'lik uzatma tüpleri, QIAGEN, #19587
	* QIAvac vakum manifoldları için VacConnectors (500) vakum konnektörleri, QIAGEN, #19407

\* Zorunlu bileşenler; karşılaştırılabilir kalite ve/veya özelliklere sahip ürünlerle değiştirilmemelidir.

### 7.4 Teçhizat

**Tablo 7: Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit için gerekli teçhizat**

Laboratuvar teçhizatı	Ürün
Elektronik aletler	1,5/2 ml'lik tüpler için santrifüj, 20.000 × g kapasite, sabit açılı rotor
	15/50 ml'lik tüpler için santrifüj, 7.197 × g kapasite, sabit açılı rotor
	96 hazneli plakalar için santrifüj, 1.000 × g kapasite, sabit açılı rotor
	Minisantrifüj, kapasite ≤ 2.000 × g

## 7 Reaktifler, sarf malzemeleri ve teçhizat

Laboratuvar teçhizatı	Ürün
	Tüpler ve 96 hazneli plakalar için eklentilere sahip vorteksleyici
	Agilent DNA Çipleri için eklentiye sahip vorteksleyici, 2.400 rpm kapasite
	Dondurucu, -15 °C ila -30 °C
	Buzdolabı, 2 °C ila 8 °C
	DNA iş istasyonu/PCR kabini
	Çeker ocak (kesinlikle önerilir)
	Sınıf II Biyolojik Güvenlik Kabinleri (kesinlikle önerilir)
	QIAGEN Connecting System
	QIAvac 24 Plus System
	Vakum pompası (230 V, 50 Hz)
	Veriti Dx 96-well Thermal Cyclers veya eşdeğeri <sup>▪</sup>
	Agilent 2100 Bioanalyzer System
	Chip Priming Station, Agilent, #5065-4401
	Illumina NextSeq™ 500/550
	2100 Expert Software, Agilent Technologies
Pipetler	1.000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl pipet
	200 µl, 20 µl çoklu 8 veya 12 kanallı pipet
	5 ila 100 ml'lik pipet tabancası
Raklar	50 ml, 15 ml, 5 ml, 1,5/2 ml'lik tüp rakı
	Tüp zincir rakı
	96 hazneli rak
	96S Super Magnet Plate, Alpaqua® SKU: A001322
	DynaMag™-2 Magnet, Thermo Fisher, #12321D
	Dondurucu saklama kutuları
Muhtelif	Film aplikatörü
	Kronometre

▪ Eşdeğerliğin kullanıcı tarafından belirlenmesi gerekmekte olup diğer termal döngüleyici cihazların kullanımı, kullanıcının kendi sorumluluğundadır.



## 8 Saklama ve kullanım

### 8.1 Nakliye koşulları

Ürün kuru buz üzerinde gönderilecektir. Ürün varır varmaz kutuda hala kuru buz bulunup bulunmadığını ve reaktiflerin donmuş halde olup olmadığını kontrol edin.

### 8.2 Genel kullanım önlemleri



Laboratuvarlardaki sıcaklık ve nemin sırasıyla 15 °C ile 25 °C ve % 20 ile % 85 arasında kalmasını sağlayın (yoğuşma/buharlaşma riskini azaltın).

Laboratuvar alanlarında bir şey yemeyin, içmeyin ve sigara kullanmayın. Teçhizat bakımını üretici talimatlarına göre gerçekleştirin.

Tüm reaktif, numune ve ilgili malzemeleri bulduğunuz yerde geçerli olan devlet yönetmeliklerine uygun olarak dekontamine ve bertaraf edin. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar için yabancı DNA ve özellikle daha önce çalıştırılan plakalardan kalan PCR ürünleriyle kontaminasyondan kaçınmak elzemdir. Önceki deneylerden kalan amplifiye ürünler, DNA kontaminasyonunun en yaygın kaynağını oluşturur.

Sağlanan reaktifler, tüm haznelerinde Bromofenol mavisi (mavi renk) içeren Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate dışında görsel olarak berrak ve renksiz görünür. Test performansını etkileyebilecek herhangi bir materyal görünümü değişikliği veya yanlış saklamadan kaynaklanan bozulma şüphesi varsa teknik desteğe başvurun (► bölüm 10 *Teknik destek*, sayfa 48/58).

### 8.3 Uyarılar ve önlemler

Bu ürün hiçbir tehlikeli materyal içermez.



Materyal Güvenlik Bilgi Formları (MSDS) <https://sysmex-iagnostics.com/products/kit-specs/> adresinde mevcuttur.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit'le ilgili meydana gelebilecek her türlü ciddi vaka, derhal üreticiye ve kullanıcının ve/veya hastanın yerleşik olduğu Üye Devletin yetkili makamına bildirilmelidir.

### 8.3.1 Özel tedbirler

İlk yardım tedbirleri

- **Genel tavsiye:** Etkilerin devam etmesi durumunda doktora danışın. Kontamine giysi ve ayakkabıları derhal çıkarın ve yeniden kullanmadan önce iyice yıkayın.
- **Solunması halinde:** Etkilenen kişiyi söz konusu alandan uzaklaştırın. Temiz hava sağlandığından emin olun.
- **Ciltle teması halinde:** Etkilenen bölgeyi sabun ve bol miktarda suyla yıkayın.
- **Gözle teması halinde:** Kontakt lensleri çıkarın. Göz kapaklarını en az 10 ila 15 dakika tamamen açık tutarak akan su altında gözü iyice yıkayın. Etkilenmemiş gözü koruyun.
- **Yutulması halinde:** Derhal doktor çağırın. Kusturmaya çalışmayın. Bilinci yerinde olmayan birine ağız yoluyla asla bir şey vermeyin.

### 8.3.2 Kullanım ve saklama

#### Genel korunma ve hijyen önlemleri

Laboratuvarda bir şey yemeyin, içmeyin, sigara kullanmayın ve ayrıldıktan önce iyi bir el yıkama tekniği uyguladığınızdan emin olun. Buhar solumayın. Gözler ve ciltle temastan kaçının. Kirli veya ıslak giysileri derhal çıkarın.

#### Güvenli kullanım önlemleri

Ürün kullanım riskleri, uygun koruyucu önlemler ve önleyici faaliyetlerle en aza indirilmelidir. Çalışma süreci, tehlikeli maddelerin açığa çıkmasına veya ciltle temasına mümkün olduğunca imkan verilmeyecek şekilde tasarlanmalıdır.

#### Yangın ve patlamaya karşı koruma tavsiyeleri

Özel tedbir alınması gerekmez.

#### Uyumsuzluklar da dahil olmak üzere güvenli depolama koşulları



Kabı kuru ve iyi havalandırılmış bir yerde sıkıca kapatılmış şekilde tutun. Açılmış kaplar dikkatlice tekrar kapatılmalı ve sızıntıyı önlemek üzere dik tutulmalıdır.

### 8.3.3 Reaktiflere ilişkin kullanım önlemleri



Reaktiflerin uygun şekilde kullanım ve bertarafını sağlayıp reaktif kontaminasyonunu önlemek üzere aşağıda listelenen önlemleri uygulayın:

- Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış reaktifleri kullanmayın.
- Reaktifleri, sağlanan talimatlara göre hazırlayın.
- Reaktifler yalnızca aynı kitte bulunan diğer reaktiflerle birlikte kullanılmalıdır.
- Farklı kitler veya lotlardan alınan reaktifler asla bir havuzda toplanmamalı veya birbiriyle değiştirilmemelidir.
- Reaktiflerin sürelerinin dolmadığından veya önerilen dondurma-çözdürme döngüsü sayısından fazla kullanılmadığından emin olmak üzere açılma tarihini kaydedin ve her kullanımdan sonra tüpleri işaretleyin.
- Sık sık eldiven değiştirerek reaktif kontaminasyonunu önleyin. Reaktif ve numune kullanımları arasında daima eldiven değiştirin.
- Kullanılmamış reaktifleri ve atıkları ülke, federal, eyalet ve yerel çevre düzenlemelerine göre bertaraf edin.

### 8.3.4 Güvenlik ve kontaminasyon önlemleri



DNA kontaminasyonundan arındırılmış laboratuvar ortamını korumak ve tüm personelin güvenliğini sağlamak üzere aşağıda listelenen önlemleri uygulayın:

- PCR öncesi ve PCR sonrası için kullanılan çalışma alanlarını ayırın ve "temiz" (amplifikasyon öncesi) alanlardan "kirlili" (amplifikasyon sonrası) alanlara doğru tek yönlü bir iş akışına uyun.
- Her çalışma alanında ilgili teçhizatın (pipetler dahil), malzemelerin, reaktiflerin, biyolojik olarak tehlikeli atıklar için kapların ve laboratuvar kılavuzlarının bulunduğundan emin olun. Bu malzemeleri asla PCR öncesi ve sonrası çalışma alanları arasında değiştirmeyin. Belirli bir alana ait olanları tanımlamak üzere teçhizat, malzemeler ve reaktiflere renk kodlaması veya etiketleme yapılması önerilir.
- Prosedür boyunca uygun kişisel koruyucu teçhizat kullanın.

- PCR öncesi ve PCR sonrası alanlarda çalışırken her zaman bir laboratuvar önlüğü (tercihen tek kullanımlık) giyip tek kullanımlık pudrasız eldivenler takın.
- Kontaminasyonu önlemek üzere hem numune ve reaktif kullanımları arasında hem de eldivenlerin dış kısmının ciltle temasından sonra eldivenleri sık sık değiştirin.
- En azından plazma hazırlama, DNA ekstraksiyonu ve QIAquick® ile PCR ürünü pürifikasyonu esnasında koruyucu gözlük kullanın.
- PCR öncesi ve sonrası laboratuvarlar arasında tek kullanımlık galoş takın veya ayakkabılarınızı değiştirin ve tek kullanımlık kol koruma kılıfları takın (PCR öncesi laboratuvarda zorunlu olup PCR sonrası laboratuvarda ise özellikle UID PCR pürifikasyonu ve İndeks PCR için önerilir).
- PCR öncesi ve PCR sonrası laboratuvar alanlarından çıkarken kişisel koruyucu teçhizatı çıkarıp atın.
- Tüm numuneleri potansiyel olarak enfeksiyöz materyal olarak ele alın. Dökülme olduğu takdirde etkilenen alanın önce deterjan/dezenfektan ve suyla, ardından ise deiyonize su kullanılarak hazırlanan ~% 0,5 sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) solüsyonuyla temizlenmesi önerilir.

**Not:** *Ev tipi ticari sıvı çamaşır suyu (örneğin Clorox marka) tipik olarak % 5,25 konsantrasyonlu sodyum hipoklorit içerir. Ev tipi çamaşır suyunun 1:10 oranında dilüsyonu ile % 0,5 sodyum hipoklorit içeren solüsyon elde edilir.*

- Pipetleme adımları için ilgili PCR kabinlerini kullanın.
- Kullanımdan sonra PCR kabinlerini, önce kuaterner amonyum bileşikli dezenfektanla (RHEOSEPT-WD plus veya eşdeğeri gibi), ardından ise nükleik asit ve nükleazların giderilmesi için tasarlanmış bir ürünle (Roti® Nucleic Acid-Free veya eşdeğeri gibi) temizleyin.
- Kullanımdan sonra PCR çalışma alanlarını nükleik asit ve nükleazların giderilmesi için tasarlanmış bir ürünle (Roti® Nucleic Acid-Free veya eşdeğeri gibi) temizleyin.
- Güvenlik kabini, PCR çalışma alanları ve laboratuvar malzemelerini (pipetler, tüp rakları ve diğer teçhizat) kullanımdan sonra ultraviyole (UV) ışıkla dekontamine edin. UV radyasyonunun etkili olmasını

sağlamak için UV ampullerindeki kalıntı birikimini düzenli olarak giderin.

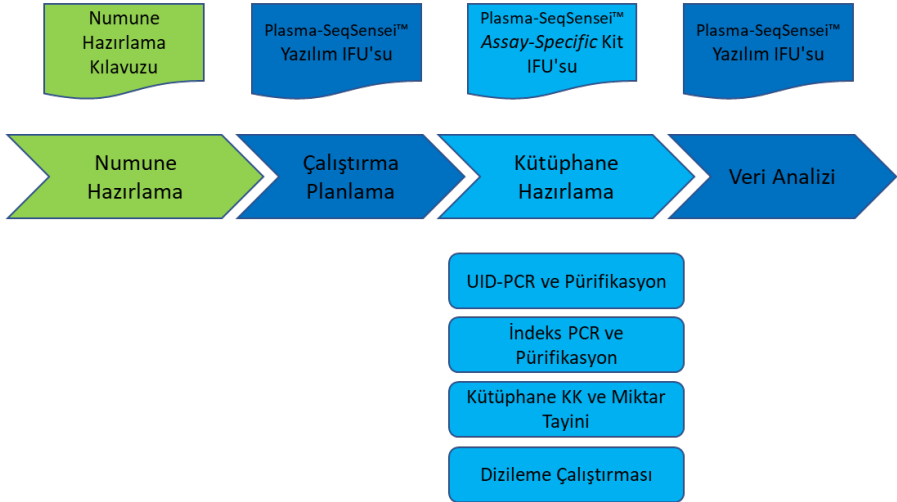
- Yalnızca aerosole dayanıklı, filtreli steril pipet uçları (lot sertifikalı, ribonükleaz, deoksiribonükleaz ve pirojen içermeyen) kullanın.
- Yalnızca PCR sınıfı reaktif ve tüp kullanın.
- Aynı anda yalnızca bir adet numune tüpünü veya reaktif tüpünü açık tutun.
- Çok kullanımlık reaktif solüsyonlarının kontaminasyona uğramasını önlemek için çalışma alikotlarını talimatlara göre hazırlayın ve doğrudan pipetlemekten kaçının.

## 9 İş akışı

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, ctDNA'yı tespit etmek üzere plazmadan miktar tayini yapılmış cfDNA'yı kullanır. Kütüphane hazırlama iş akışını (Şekil 4) bu IFU'da açıklandığı gibi başlatmadan önce numune hazırlama iş akışının Sysmex Inostics Numune Hazırlama Kılavuzu'nda açıklandığı şekilde tamamlandığından emin olun.

Ayrıca Plasma-SeqSensei™ IVD Software IFU'sunun ilk bölümünü oluşturan çalışma planlaması da tamamlanmış olmalıdır. DNA içeriğinin yüksekliğinden dolayı numunelerin dilüe edilmesi gerekiyorsa bu IFU'da bulunan ► bölüm 9.1 UID PCR (Multipleks PCR), sayfa 22/58'e bakın.

Şekil 4, tek tek iş akışı adımlarının yanı sıra tüm Plasma-SeqSensei™ işlemi için hangi IFU veya Kılavuzların takip edileceğini de içeren işlemi açıklar.



Şekil 4: İş akışı adımları ile gerekli belgeleri içeren Plasma-SeqSensei™ işlemi.



Her bir Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, tek bir plaka üzerinde en fazla 16 numuneyi analiz etmek üzere tasarlanmıştır.

Aynı dizileme çalıştırmasında 16'dan fazla numune çalıştırılacaksa ikinci bir Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit'in yanı sıra bir Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit'in de edinilmesi gerekir.

İkinci plakadaki numuneler (17 ile 32 arası numuneler) için orijinal Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit'te bulunan Index Primer Plate IND34 (Plate A) yerine Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit'te bulunan Index Primer Plate **IND35 (Plate B)** kullanılmalıdır.



**Uyarı:** Aynı Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate (örneğin IND34) aynı çalıştırmada iki kez kullanıldığında sonuçlar analiz edilemez.

İki plaka kullanılacaksa diğer plakaya geçmeden önce iş akışının her adımı için her seferinde yalnızca bir plaka hazırlayın. Her plaka bir Pozitif Kontrol (PC) ve bir No Template Control (NTC) içerir.

**Not:** Daima mümkün olan en küçük dizileme kitini kullanın. NextSeq™ High Output kit v2.5 yalnızca 5 veya daha fazla numuneye kullanılabilir.

## 9.1 UID PCR (Multipleks PCR)

Multipleks UID PCR'de benzersiz moleküler barkod dizileri eklenirken tüm hedef bölgeler birlikte amplifiye edilir. UID'ler önemli ölçüde arka plan azalmasına yol açarak Plasma-SeqSensei™ teknolojisinin ultra yüksek hassasiyete sahip olmasını sağlar.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kiti kullanılarak DNA girdisi 4,3 ile 86 ng/116 µl arasında olan numuneler analiz edilebilir. Daha yüksek DNA içeriğine sahip numunelerin dilüe edilmesi gerekir. 4,3 ng/116 µl'den az olan numuneler doğrulanmamıştır ve geçersiz sonuçlar verir.

**Not:** Qubit numune ölçümü, numune yükünü belirlemek amacıyla girdi olarak kullanılacak DNA'nın sadece kaba bir tahminini verir. Numunelerin nihai ve muhtemelen farklı olacak miktar tayini, dahili miktar tayin edici (Quantispike) kullanılarak kütüphane dizileme esnasında gerçekleştirilir.

**Tavsiye:** En iyi sonuçların elde edilebilmesi için 86 ng/116 µl veya altı numuneler için bile mümkün olduğunda numune başına **43 ng/116 µl DNA girdisi** kullanılmasını öneririz.

Gerekli kitler ve reaktifler:

- **Breast Cancer Mpx A** (mavi kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR851013
- **Breast Cancer Mpx B** (sarı kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR851014
- **Breast Cancer Positive Control** (kırmızı kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR855006
- **No Template Control** (şeffaf kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR854002
- **Quantispike** (yeşil kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR856001
- **PCR Master Mix v2, 2x** (siyah kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR850001

Aşağıdaki adımlar PCR öncesi laboratuvardaki numune hazırlama alanında gerçekleştirilir.

Hazırlama:

- Tüm donmuş reaktifler, DNA numuneleri ve kontroller:
  - Çözdürme
  - 5 sn. vorteks
  - 2 sn. santrifüj
- Numunelerin toplam DNA içeriğini kontrol edin.  
Toplam DNA içeriğinin çok yüksek olması durumunda (örneğin > 86 ng/116 µl) numuneyi aşağıdaki hesaplama göre dilüe edin.
- Dilüsyon gerektiren tüm numuneler için 1,5 ml LoBind® tüpleri etiketleyin.
- Numune tüpü şeritlerini plaka düzenine göre anlaşılır şekilde etiketleyin.

DNA dilüsyonu:

DNA konsantrasyonu, maksimum girdi olan 86 ng/116 µl'i aşıyorsa veya üst sınıra yakınsa aşağıdaki hesaplamalara göre **43 ng/116 µl'**ye dilüe edilmiş bir numune kullanarak yeni bir tüp hazırlamanızı öneririz:

$$\text{Dilüsyon faktörü} = \frac{\text{ng/116 } \mu\text{l cinsinden ölçülen konsantrasyon}}{43 \text{ ng/116 } \mu\text{l}}$$

$$\text{Gerekli eluat hacmi } [\mu\text{l}] = \frac{135 \mu\text{l}}{\text{dilüsyon faktörü}}$$



toplam 135 µl eluat hacmiyle (ayrıntılar için bkz. numune hazırlama kılavuzu ► bölüm 4.2 Dolaşımdaki DNA'nın plazmadan pürifikasyonu)

**AVE buffer hacmi** [µl] = 135 µl – gerekli eluat hacmi

**Dilüe edilmiş numune** [135 µl]  
= gerekli eluat hacmi + AVE buffer hacmi

**Not:** Numunenin dilüsyonunda kullanılan AVE buffer, QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit'in (QIAGEN) bir parçasıdır (ayrıntılar için bkz. numune hazırlama kılavuzu ► bölüm 4.2 Dolaşımdaki DNA'nın plazmadan pürifikasyonu).

#### Dilüe edilmiş numuneler için yeniden miktar tayini

Dilüe edilmiş numunelerde Qubit™ kullanarak numune hazırlama kılavuzundaki ► bölüm 4.3 *Numune miktar tayini (Qubit™)* uyarınca dilüsyonların miktar tayinini yeniden gerçekleştirin.

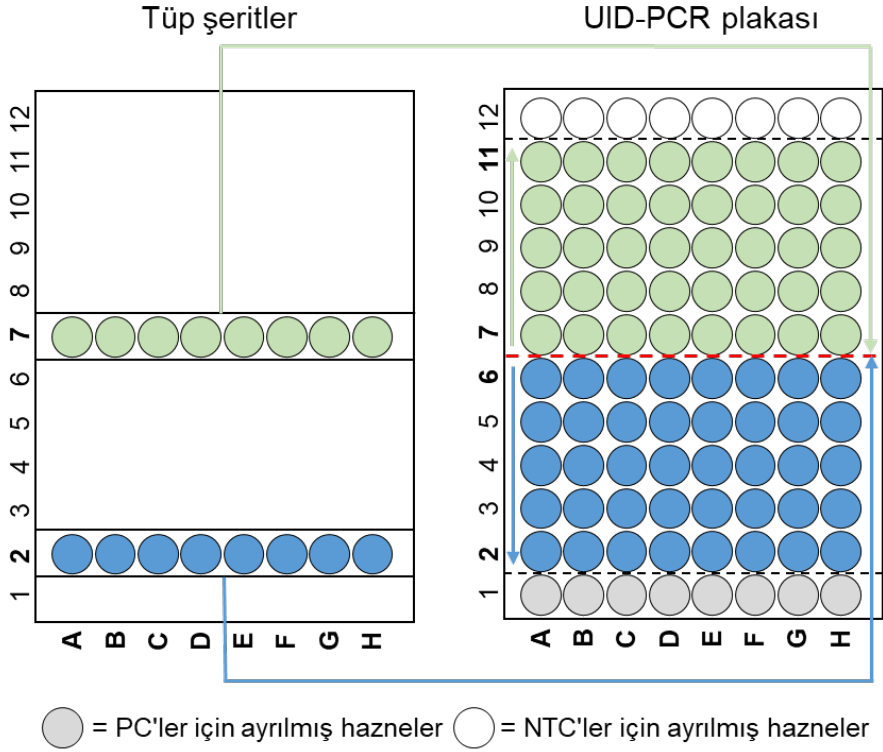
#### UID PCR kurulumu:

**Not:** İzole edilmiş plazma numune DNA'sı, hazne başına 5 replika olarak Multipleks PCR işlemine tabi tutulur. Pozitif ve Negatif Kontrol, tekli replikalar halinde analiz edilir (kolon 1 ve 12).

**Not:** Numuneler, Şekil 5 üzerinde gösterildiği gibi çok kanallı bir pipet kullanılarak UID PCR plakasına kolon kolon eklenir (kontaminasyonu önlemek için). Numune tüpü şeritleri, UID PCR plakasına paralel olarak yerleştirilmelidir.

**Not:** İş akışı esnasında numuneleri karıştırmayın.

**Not:** 16'dan fazla numune işleniyorsa her seferinde yalnızca tek bir plaka için UID PCR kurulumu gerçekleştirin.



**Şekil 5: Tüp şeritlerinden UID PCR plakasına pipetleme yaparken kullanılan pipetleme şeması**

1. Plaka başına UID PCR Çalışma Karışımı hazırlama işlemini Tablo 8 üzerinde gösterildiği gibi gerçekleştirin: "UID PCR Working Mix" (UID PCR Çalışma Karışımı). Tek kanallı bir pipet kullanmak suretiyle 10 kez yukarı ve aşağı doğru pipetleyerek karıştırın. PC ve NTC için gereken UID PCR Çalışma Karışımı hacmi, hesaplamalarda dikkate alınır (bkz. Tablo 8).

**Tablo 8: Plaka başına UID PCR Çalışma Karışımı pipetleme şeması**

Numune sayısı (1 numune = 5 replika), % 15 fazlalıkla	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	400	567	734	900	1.067	1.234	1.401	1.567
Breast Cancer Mpx A [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Breast Cancer Mpx B [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Quantispike [µl]	3,0	4,3	5,6	6,8	8,1	9,4	10,6	11,9
Nihai hacim (toplam)	481,0	681,3	881,6	1.080,8	1.281,1	1.481,4	1.681,6	1.880,9

Numune sayısı (1 numune = 5 replika), % 15 fazlalıkla	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	1.734	1.901	2.068	2.234	2.401	2.568	2.735
Breast Cancer Mpx A [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Breast Cancer Mpx B [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Quantispike [µl]	13,2	14,4	15,7	17,0	18,2	19,5	20,7
Nihai hacim (toplam)	2.081,2	2.281,4	2.481,7	2.681,0	2.881,2	3.081,5	3.281,7

**Not:** Bir PC ve bir NTC hacmi dahil edilmiştir.

2. Plaka düzenine göre kolon 1 ve 12'deki haznelere 34,8 µl UID PCR Çalışma Karışımı ekleyin.
3. Plaka düzenine göre kolon 1'deki hazneye 23,2 µl Pozitif Kontrol ekleyin ve 10 kez yukarı aşağı pipetleyerek PC'yi karıştırın.  
Plaka düzenine göre kolon 12'deki hazneye 23,2 µl Negatif Kontrol ekleyin ve 10 kez yukarı aşağı pipetleyerek NTC'yi karıştırın.
4. Bir tüp şeridindeki her numune için 187,5 µl UID PCR Çalışma Karışımı alikotlayın.
5. Tüp şeridinin ilgili tüpüne 125 µl numune ekleyin ve 10 kez yukarı aşağı pipetleyerek karıştırın.
6. 200 µl çok kanallı pipeti kullanarak 58 µl Numune + Çalışma Karışımını plaka düzenine göre 5 hazne içine alikotlayın.
7. Plakayı yapışkan PCR filmiyle kaplayıp 5 saniye boyunca 1.000 x g'de döndürün.

- Plakayı PCR döngüleyiciye yerleştirin. Döngüleyiciyi başlatın, oturum açın ve 15 dakika içinde "UID BC\_v1" (Tablo 9) döngüleme programını başlatın.

**Tablo 9: UID BC\_v1'in Tt profili**

PCR döngüleyici: Veriti

Hacim ayarı: 50 µl

Isıtıcı kapak

Kapak sıcaklığı

96 °C

#	T [°C]	Süre [dk:sn]	Git #	Döngü sayısı
1	98	02:00	Yok	1
2	98	00:20	Yok	13
3	63	01:30	Yok	13
4	72	00:10	2	13
5	72	02:10	Yok	1
6	4	∞	Yok	1

- 16'dan fazla numune işleniyorsa ikinci bir UID PCR plakası kullanmak suretiyle 1 adımından başlayarak UID PCR prosedürünü tekrarlayın.
- UID PCR plakasını PCR sonrası laboratuvarında 2 °C ile 8 °C arasında 14 güne kadar, -15 °C ile -30 °C arasında 2 aya kadar saklayın veya doğrudan UID PCR pürifikasyonuna geçin (► bölüm *UID PCR pürifikasyonu*, sayfa 27/58).

### 9.2 UID PCR pürifikasyonu

Agencourt AMPure® XP Kit, bir sonraki İndeks PCR'de enterferansa neden olabilecek fazla primerleri gidermekte kullanılır.

Gerekli kitler ve reaktifler:

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, #A63881
- **Buffer EB** (Elüsyon Buffer'ı), QIAGEN, #19086
- **Etanol** (EtOH) ≥ % 99,8, p.a.
- **Ribonükleaz ve deoksiribonükleaz içermeyen distile su**

Aşağıdaki adımlar PCR sonrası laboratuvarda gerçekleştirilir.

Hazırlama:

- Plaka 2 °C ile 8 °C arasında bir sıcaklıkta saklanmışsa "Remove Condensate\_v1" (Tablo 10) PCR programını çalıştırın.

#### Tablo 10: Remove Condensate\_v1'in Tt profili

PCR döngüleyici: Veriti

Hacim ayarı: 50 µl

Isıtıcı kapak Kapak sıcaklığı 105 °C

#	T [°C]	Süre [dk:sn]	Git #	Döngü sayısı
1	4	02:00	Yok	1

- Filmi çıkarmadan önce plakayı 5 saniye boyunca 1.000 x g'de santrifüjleyin.
- Sıvı atıklar için bir çöp kutusu bulundurun.
- Yeni bir % 70 EtOH hazırlayın (Tablo 11). Tüpü 10 kez ters yüz ederek çevirin.

**Tavsiye:** *Pürifikasyon prosedürünün 3 adımındaki inkübasyon esnasında % 70 EtOH hazırlayın.*

#### Tablo 11: % 70 EtOH hazırlama

	Yarım plaka (8 numune)	Tam plaka (16 numune)
EtOH (≥ % 99,8, p.a.)	9,1 ml	17,5 ml
Distile su	3,9 ml	7,5 ml
Toplam	13 ml	25 ml

- Boncukları 15 °C ila 25 °C'ye (~30 dakika) dengeleyin ve şişeyi çalışma yüzeyinde yatay olarak yuvarlayarak yeniden süspans edin. Yavaşça yuvarlayıp her 180 derece dönüşten sonra duraklayın ve sıvı akana kadar bekleyin. Boncuklar homojen bir şekilde yeniden süspans olana ve hiçbir çizgi görünmeyecek hale gelene kadar tekrarlayın. Arada bir şişeyi ters yüz edin. Boncuk şişesini vortekslemeyin.

- AMPure® boncuk solüsyonunu (Tablo 12) 1 ml'lik pipet kullanarak bir rezervuara ekleyin.

**Tablo 12: Gerekli AMPure® boncuk hacmi**

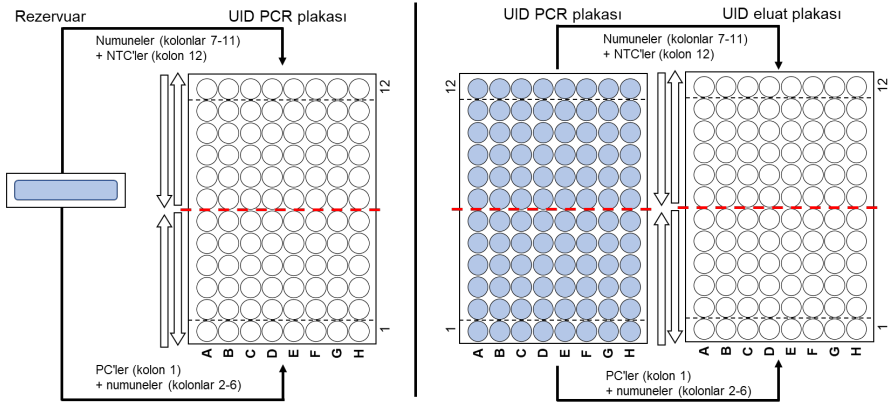
Yarım plaka (8 numune)	Tam plaka (16 numune)
4,4 ml	8,3 ml

- İki UID PCR plakası kullanılacaksa UID PCR Pürifikasyon iş akışını her seferinde yalnızca bir plaka için gerçekleştirin.

### Pürifikasyon prosedürü:

1. Aşağıdaki adımlar için çok kanallı bir pipet kullanın. UID PCR ve UID eluat plakaları birbirine paralel olarak yerleştirilmeli ve pipetleme işlemi kolon bazında gerçekleştirilmelidir (sıra bazında değil Şekil 6).

**Not:** Tüm adımları soldan sağa doğru pipetleyerek gerçekleştirin.



**Şekil 6: Rezervuardan UID PCR Plakasına (sol) veya UID PCR plakasından (sağ) bir UID eluat plakasına pipetleme yaparken kullanılan pipetleme şeması.**

2. UID PCR plakasının her bir haznesine 81 µl AMPure® boncuk ekleyin ve 10 kez yukarı aşağı yavaşça pipetleyerek karıştırın.

**Not:** Her aspirasyondan önce AMPure® boncuklarını rezervuarda 3 kez yeniden süspanse edin.

**Not:** *Boncukların kurumadığından kesinlikle emin olun.*

3. UID PCR plakasını 15 °C ile 25 °C arasında 10 dakika boyunca inkübe edin.
4. UID PCR plakasını mıknatıs plakasına (Alpaqua) yerleştirin ve 5 dakika inkübe edin.
5. Tüm boncukların mıknatıs üzerinde olduğundan emin olun. 134 µl pipetleyerek süpernatantı dikkatlice çıkarın.

**Not:** *Ayrılmış manyetik boncuk halkasını bozmayın. Pipet ucunu haznenin dibine doğru kenarlara değdirmeden hareket ettirin.*

6. % 70 EtOH'yi bir rezervuara aktarın (Tablo 13).

**Tablo 13: Gerekli % 70 EtOH hacmi**

Yarım plaka (8 numune)	Tam plaka (16 numune)
13 ml	25 ml

7. Her bir hazneye yeniden süspansiyon etmeksizin 100 µl % 70 EtOH ekleyin. 30 saniye boyunca inkübe edin.
8. Plakayı mıknatıs üzerinde tutun. 110 µl EtOH'yi dikkatlice çıkarıp atın.
9. Her bir hazneye yeniden süspansiyon etmeksizin 100 µl % 70 EtOH ekleyin. 30 saniye boyunca inkübe edin.
10. Plakayı mıknatıs üzerinde tutun. 100 µl EtOH'yi dikkatlice çıkarıp atın.
11. Kalıntı EtOH'yi 20 µl'lik çok kanallı bir pipet kullanarak çıkarın.
12. UID PCR plakasını mıknatıstan çıkarın ve 2 dakika boyunca kurumaya bırakın.
13. Bir rezervuara gereken hacimde Buffer EB ekleyin (Tablo 14).

**Tablo 14: Gerekli Buffer EB hacmi**

Yarım plaka (8 numune)	Tam plaka (16 numune)
7 ml	13 ml

14. DNA'yı elüe etmek üzere her bir hazneye 120 µl Buffer EB ekleyip en az 10 kez yukarı aşağı doğru dikkatlice karıştırın.
15. Tüm boncukların solüsyon içinde bulunduğunu görsel olarak kontrol edin.
16. UID PCR plakasını 15 °C ile 25 °C arasında 2 dakika boyunca inkübe edin.
17. UID PCR plakasını mıknatıs üzerine yerleştirip 1 dakika boyunca inkübe edin.
18. Her haznedeki 110 µl eluatı dikkatlice yeni bir UID eluat plakasına aktararak UID PCR plakasını atın.
19. Doğrudan İndeks PCR işlemiyle devam edin veya UID eluat plakasını kapatın. Plakayı 2 °C ila 8 °C sıcaklıkta 7 güne kadar, -15 °C ila -30 °C sıcaklıkta ise 2 aya kadar saklayın.
20. 16'dan fazla numune işleniyorsa ikinci UID PCR plakasını kullanmak suretiyle 2 adımdan başlayarak UID PCR pürifikasyon prosedürünü tekrarlayın.

### 9.3 İndeks PCR

İndeks PCR, indeksleme etiketleri (hazne barkodları) ve Illumina dizileme adaptörleri eklenirken pürifiye edilmiş UID PCR ürünlerini amplifiye etmek için gerçekleştirilir.

Her bir Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, en fazla 16 numune için kullanılabilecek bir Index Primer Plate IND34 (Plate A) içerir. Bir dizileme çalıştırmasında 16'dan fazla numune analiz ediliyorsa Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit'te bulunan ikinci Index Primer Plate IND35 (Plate B) kullanılmalıdır.

**Not:** Aynı dizileme çalıştırmasında aynı Index Primer Plate'i iki kez **kullanmayın**. Daima iki farklı Index Primer Plate (IND34 + IND35 / Plate A + Plate B) kullanın.

Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate hazneleri tek kullanımlıktır.



Kuru Index Primer Plate konumları, Plasma-SeqSensei™ IVD Software'in Çalıştırma planlama aracındaki plaka düzeninin yanı sıra nihai PCR plakasındakilerle de eşleşmelidir (Şekil 7). Hangi haznelerin halihazırda kullanılmış olduğunu lütfen not edin. Sonraki çalıştırmayı planlarken kalan indeks konumlarını/haznelerini kullanın ve bilgileri yazılıma aktarın.

Plate A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	Sample1				Sample2				NTC		
B		Sample3				Sample4						
C		Sample5				Sample6						
D		Sample7				Sample8						
E												
F												
G												
H												

**Şekil 7: İndeks PCR için plaka düzeni örneği**

Gerekli kitler ve reaktifler:

- **Index Primer Plate IND34** (Plate A), Sysmex Inostics, #ZR852004
- *opsiyonel*: **Index Primer Plate IND35** (Plate B), Sysmex Inostics, #ZR852005
- **PCR Master Mix v2, 2x** (siyah kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR850001
- **Su, nükleazsız** (şeffaf/beyaz kapaklı), Sysmex Inostics, #ZR224006
- **Buffer EB** (Elüsyon Buffer'ı), QIAGEN, #19086

**Aşağıdaki adımlar PCR sonrası laboratuvarında gerçekleştirilir.**

Hazırlama:

- Tüm reaktifleri sağlayın:
  - Çözdürme
  - 5 sn. vorteks
  - 2 sn. santrifüj
- Gerekli tüm plastikleri (İndeks PCR Çalışma Karışımı tüpü, tek kullanımlık rezervuar, DIL plakası, İndeks PCR plakası) etiketleyin.
- Gereken Buffer EB'yi (Tablo 15) bir rezervuara yerleştirip kullanana kadar kapağını kapatın.

**Tablo 15: Gerekli Buffer EB hacmi**

Yarım plaka (8 numune)	Tam plaka (16 numune)
5,5 ml	10 ml

- Plaka 2 °C ile 8 °C arasında bir sıcaklıkta saklanmışsa "Remove Condensate\_v1" (Kondansat v1'i Çıkar) PCR programını çalıştırın.
- UID eluat plakası saklanmışsa 5 saniye boyunca 1.000 x g'de döndürün.
- İki UID eluat plakası işleniyorsa İndeks PCR iş akışını her seferinde yalnızca tek bir plaka için gerçekleştirin.

### Dilüsyon (DIL) plakası hazırlama:

**Not:** DIL plakası hazırlığının tüm adımlarında çok kanallı bir pipet kullanın.

**Not:** Plaka saklanmışsa UID eluat plakasındaki her bir hazneyi 5 kez yukarı aşağı pipetleyerek karıştırın.

1. UID eluat plakasını mıknatıs üzerine yerleştirip 1 dakika boyunca inkübe edin.
2. DIL plakasına plaka düzenine göre hazne başına 99 µl Buffer EB ekleyin.
3. UID eluat plakasından DIL plakasına hazne başına 5 µl aktarın ve pipet ucunu 3 kez yukarı aşağı pipetleyerek durulayın.
4. Yukarı aşağı 10 kez 70 µl pipetleyerek iyice karıştırın.
5. UID eluat plakasını kapatın. Kalıntı hacmine sahip plakayı 2 °C ila 8 °C sıcaklıkta 7 güne kadar, -15 °C ila -30 °C sıcaklıkta ise 2 aya kadar saklayın.

### Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate'i hazırlama:

6. Index Primer Plate'i 5 saniye boyunca 1.000 x g'de döndürün.
7. Alüminyum folyoyu 200 µl'lik uçlarla delerek hazne için gerekli miktarda Index Primer Plate hazırlayın.

**Not:** Doğru Index Primer Plate'in (IND34 veya IND35 / A veya B) doğru yerde kullanıldığından emin olun.

İndeks PCR'yi hazırlama:

8. İndeks PCR Çalışma Karışımını Tablo 16 uyarınca hazırlayın. Karışımı 5 saniye boyunca vorteksleyip 2 saniye boyunca döndürün.

**Tablo 16: Plaka başına İndeks PCR Çalışma Karışımı pipetleme şeması**

Numune sayısı, % 10 fazlalıkla	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	165	234	303	371	440	509	578	646
Su, nükleazsız [µl]	99	140	181	223	264	305	347	388
Nihai hacim (toplam)	264	374	484	594	704	814	925	1.034

Numune sayısı, % 10 fazlalıkla	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	715	784	853	921	990	1.059	1.128
Su, nükleazsız [µl]	429	470	512	553	594	635	677
Nihai hacim (toplam)	1.144	1.254	1.365	1.474	1.584	1.694	1.805

**Not:** Bir PC ve bir NTC hacmi dahil edilmiştir.

9. Index Primer Plate'e hazne başına 20 µl İndeks PCR Çalışma Karışımı ekleyin.

**Tavsiye:** Çalışma Karışımını plakaya transfer etmek üzere çok kanallı pipetlerle tüp şeritlerine aktarın. Her seferinde yeni pipet uçları kullandığınızdan emin olun.

10. DIL plakasından Index Primer Plate'e 5 µl şablon ekleyip reaktifler yeniden süspansiyon olana dek 10 kez yukarı aşağı pipetleyerek iyice karıştırın. Çok kanallı bir pipet kullanın. Kullanımın ardından DIL plakasını atın.

**Not:** Numunelerin karışmasını önlemek için DIL plakası ile Plasma-SeqSense™ Index Primer Plate'in doğru yerleştirildiğini görsel olarak onaylayın.

**Not:** Yeniden süspansiyonun ardından hazne diplerinde mavi noktalar olup olmadığını kontrol edin. Mavi nokta, reaktiflerin yetersiz şekilde yeniden süspansiyon edildiğini gösterir. Mavi noktalar hala görünüyorsa bunlar görünmeyene ve sıvı maviye dönene kadar 10 kez yukarı aşağı pipetleyerek yeniden süspansiyonu tekrarlayın.

11. Index Primer Plate'i yapışkan PCR filmiyle kaplayıp 5 saniye boyunca 1.000 x g'de döndürün.
12. Index Primer Plate'in yalnızca bir kısmının kullanılması durumunda, Index Primer Plate'in tüm hacmini yeni bir PCR plakasına aktarın.  
**Not:** Numunelerin karışmasını önlemek için Plasma-SeqSense™ Index Primer Plate ve yeni PCR plakasının doğru yerleştirildiğini onaylayın.  
**Tavsiye:** 1x 200 µl çok kanallı pipet yerine 2x 20 µl çok kanallı pipet kullanın.
13. Yeni PCR plakasını yapışkan PCR filmiyle kaplayıp 5 saniye boyunca 1.000 x g'de döndürün.
14. Index Primer Plate'in kullanılmış haznelerini kapatın (yalnızca Index Primer Plate atılmıyacaksa geçerlidir) ve karanlıkta 2 °C ila 8 °C sıcaklıkta saklayın.
15. PCR'yi "IDX BC\_v1" (Tablo 17) programıyla 15 dakika içinde başlatın.

**Tablo 17: IDX BC\_v1'in Tt profili**

PCR döngüleyici: Veriti

Hacim ayarı: 25 µl

Isıtıcı kapak Kapak sıcaklığı: 96 °C

#	T [°C]	Süre [dk:sn]	Git #	Döngü sayısı
1	98	00:30	Yok	1
2	98	00:10	Yok	20
3	65	00:10	Yok	20
4	72	00:10	2	20
5	72	05:00	Yok	1
6	4	∞	Yok	1

16. 16'dan fazla numune işleniyorsa ikinci UID eluat plakasını kullanmak suretiyle 1 adımından başlayarak İndeks PCR prosedürünü tekrarlayın.
17. PCR sonrasında İndeks PCR plakalarını 1.000 x g'de 5 saniye boyunca döndürün. Plakaları 2 °C ila 8 °C sıcaklıkta 7 güne kadar,

-15 °C ila -30 °C sıcaklıkta ise 2 aya kadar saklayın veya doğrudan İndeks PCR pürifikasyonuna geçin.

## 9.4 İndeks PCR pürifikasyonu

**Önemli:** *Bu adım, bir plakanın tüm numune ve kontrol haznelarını tek bir kütüphanede birleştirir. İki plaka hazırlanmışsa (IND34 ve IND35 / Plate A ve Plate B) iki dizileme kütüphanesi elde etmek için yalnızca tek bir plakadaki numune ve kontrolleri birleştirin. Ayrıca pürifikasyon işlemi, sonraki dizilemeleri aksatabilecek dNTP'leri, primerleri, primer dimerlerini ve tuzları ortadan kaldırır.*

Gerekli kitler ve reaktifler:

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, A63881
- **QIAquick® PCR Purification Kit**, QIAGEN, #28104 veya #28106
- **Buffer PB**, QIAGEN, #19066
- **Etanol (EtOH) ≥ % 99,8**, p.a.
- **Ribonükleaz ve deoksiribonükleaz içermeyen distile su**

Aşağıdaki adımlar PCR sonrası laboratuvarında gerçekleştirilir.

Hazırlama:

- Plaka 2 °C ile 8 °C arasında bir sıcaklıkta saklanmışsa "Remove Condensate\_v1" (Kondansat v1'i Çıkar) PCR programını çalıştırın.
- Gerekli tüm plastikleri (EtOH dilüsyon tüpü, PB dilüsyon tüpü/tüpleri, spin kolonu/kolonları, QIAquick® eluat tüpü/tüpleri, İndeks eluat tüpü/tüpleri) etiketleyin
- Sıvı atıklar için bir çöp kutusu hazırlayın.
- Tablo 18 uyarınca yeni bir % 70 EtOH hazırlayın. 10 kez ters yüz ederek çevirin.

**Tablo 18: % 70 EtOH hazırlama**

Reaktif	Hacim
EtOH ≥ % 99,8, p.a. [ml]	2,8
Distile su [ml]	1,2
Gereken hacim [ml]	4,0

- Filmi çıkarmadan önce İndeks PCR plakasını 5 saniye boyunca 1.000 x g'de döndürün.
- **Bir plakadaki tüm haznelerde (numuneler ve kontroller)** bulunan tüm sıvıyı 20 µl pipet kullanarak ve 2 x 15 µl pipetleyerek uygun bir kaba toplayın.

**Not:** Çok kanallı bir pipet kullanıyorsanız kolon başına tüm hazneleri önce yeni bir PCR plaka şeridinin bir sırasında havuzlayın. Ardından her haznenin içeriğini tek kanallı pipetle uygun bir kaba aktarın.

- İki İndeks PCR plakası kullanılacaksa İndeks PCR Pürifikasyonunu her seferinde yalnızca bir plaka için gerçekleştirin.

**Not:** Bu protokolda aşağıdaki adımlar için tek kanallı bir pipet kullanın.

### QIAquick® ile 1. pürifikasyon:

1. QIAquick® PCR Purification Kit'le pürifikasyon için üretici el kitabında bulunan "Vakum Manifoldu ile QIAquick PCR Pürifikasyonu" protokolüne bakın. İşleme ilişkin farklılıklar aşağıda açıklanmıştır.
2. İlk olarak ilgili tüpe hesaplanan hacimde (bkz. Tablo 19) Buffer PB ekleyip 3 saniye boyunca vorteksleyin ve 2 saniye boyunca 500 x g'de döndürün.

**Tablo 19: Gerekli Buffer PB hacmini hesaplama**

Reaktif	Hazne başına	___ x hazne
Numune hacmi [µl]	25	
Buffer PB [µl]	125	
Toplam hacim [µl]	150	

3. Aşağıdaki PCR pürifikasyon adımlarını QIAGEN el kitabında açıklanan talimatlara göre gerçekleştirin.

**Not:** Kolonun maksimum yükleme hacmi 800 µl'dir. Havuzlanmış numune hacimleri 800 µl'den büyükse bir uzatma tüpü kullanın veya tekrar yükleme yapın.

**Not:** Her adımda kolona doğru hacim uygulandığını ve sıvının tamamının filtreden geçtiğini görsel olarak doğrulayın.

**Not:** Kolonların tıkanması durumunda QIAGEN el kitabındaki sorun giderme kılavuzuna bakın.

4. DNA elüsyonu için 1,5 ml'lik temiz bir LoBind® tüpüne bir QIAquick® kolonu yerleştirin.
5. QIAquick® membranının ortasına 50 µl Buffer EB ekleyin ve son santrifüj adımından önce 15 °C ile 25 °C sıcaklıkta 1 dakika boyunca inkübe edin.

**Not:** İki kez elüe etmeyin.

#### AMPure® boncuklarıyla 2. pürifikasyon:

6. 45 µl eluata yeni bir LoBind® tüpüne aktarın. Önceki tüpü atın.
7. A) Orijinal AMPure® şişesini kullanırken boncukların 15 °C ile 25 °C'ye (~30 dakika) dengelenmesini bekleyin ve şişeyi çalışma yüzeyinde yatay olarak yuvarlayarak yeniden süspansiyon edin. Yavaşça yuvarlayıp 180 derece dönüşten sonra duraklayın ve sıvı akana kadar bekleyin. Boncuklar homojen bir şekilde yeniden süspansiyon olana kadar tekrarlayın. Boncuk şişesini vortekslemeyin.  
B) AMPure® boncuk alikotlarını kullanırken 15 °C ile 25 °C'ye dengelenmelerini bekleyin ve boncukları en az 10 kez ters yüz ederek karıştırın. Tüm boncukların tamamen yeniden süspansiyon olduğundan emin olun.
8. Eluata 40 µl AMPure® boncuk ekleyip 10 saniye boyunca vorteksleyin ve 3 saniye boyunca döndürün.
9. 15 °C ile 25 °C'de 5 dakika boyunca inkübe edin.
10. Tüpü açıp DynaMag-2'ye yerleştirin ve 15 °C ile 25 °C'de 2 dakika boyunca inkübe edin.

Aşağıdaki adımlar (11 ila 15) tüpler manyetik raktayken gerçekleştirilir:

11. 100 µl'ye ayarlanmış 200 µl'lik bir pipet kullanarak süpernatantı çıkarıp atın.

**Not:** Tüpü ~1 cm havaya kaldırın ve tüm boncukların sabitlendiğinden emin olmak için tabanı tamamen mıknatısa doğru bastırın.

12. 500 µl % 70 EtOH ekleyip 15 °C ila 25 °C'de 30 saniye boyunca inkübe edin.
13. Süpernatantı çıkarıp atın.
14. 500 µl % 70 EtOH ekleyip 15 °C ila 25 °C'de 30 saniye boyunca inkübe edin. İnkübasyon esnasında etkin karışımı sağlamak üzere tüpü dikey eksen etrafında 180 derece döndürün. En erken 5 saniye sonra yavaşça geri çevirin.
15. Süpernatantın tamamını çıkarıp atın. Kalıntı EtOH'yi 20 µl'lik bir pipet kullanarak çıkarın.
16. Tüpü DynaMag-2'den çıkarın ve kapağı açık olarak 15 °C ila 25 °C'de 2 dakika boyunca kurumaya bırakın.
17. 15 µl Buffer EB ekleyin ve 10 saniye boyunca vorteksleyerek boncuk karışımını tamamen yeniden süspanse edin. 3 saniye döndürüp 15 °C ila 25 °C'de 1 dakika boyunca inkübe edin.
18. Tüpü açıp DynaMag-2'ye yerleştirin ve 15 °C ila 25 °C'de 1 dakika boyunca inkübe edin.
19. Süpernatantın tamamını "Index eluate" (İndeks eluatı) tüpüne aktarmak için 20 µl'ye ayarlanmış 20 µl'lik bir pipet kullanın.

**Not:** Tüpü ~1 cm havaya kaldırın ve tüm boncukların sabitlendiğinden emin olmak için tabanı tamamen mıknatısa doğru bastırın.

20. QIAquick® eluatıyla etiketlenmiş tüpü atın.
21. "Index eluatı" tüpünü 2 °C ila 8 °C sıcaklıkta 7 güne kadar, -15 °C ila -30 °C sıcaklıkta 2 aya kadar saklayın veya doğrudan Bioanalyzer miktar tayinine geçin.
22. 16'dan fazla numune işleniyorsa ikinci İndeks PCR plakasını kullanmak suretiyle 2 adımından başlayarak İndeks PCR pürifikasyon prosedürünü tekrarlayın.



## 9.5 Kütüphane KK (Bioanalyzer)

Kütüphane KK, her kütüphanenin yan ürün ve ortalama boyut belirleme kontrolü için bir Bioanalyzer kullanarak gerçekleştirilir. Miktar tayinleri, her kütüphane için üç replikalı olarak gerçekleştirilmelidir.

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, Agilent'in Bioanalyzer DNA 1000 Kit'i kullanılarak geliştirilmiştir.

Gerekli kitler ve reaktifler:

- **DNA 1000 Kit**, Agilent, #5067-1504
- **Buffer EB** (Elüsyon Buffer'ı), QIAGEN, #19086
- **Ribonükleaz ve deoksiribonükleaz içermeyen distile su**

Aşağıdaki adımlar PCR sonrası laboratuvarında gerçekleştirilir.

### Bioanalyzer'ı Hazırlama:

Reaktiflerin 15 °C ila 25 °C'de karanlıkta 30 dakika boyunca dengelenmesini bekleyin.

Adımların tamamı için Agilent Bioanalyzer el kitabına bakın.

**Not:** Numune ölçümü üç teknik replika halinde gerçekleştirilmelidir.

Bioanalyzer dilüsyonunu (BA\_DIL) hazırlama:

1. **BA\_DIL için gereken hacimleri hesaplayın:**

$$\text{Dilüsyon faktörü} = \frac{\text{Toplam DNA girdisi}}{43}$$

*her bir pozitif kontrol (PC) için ng/116 µl + 4,3 ng olarak analiz edilmiş tüm numunelerin toplam DNA girdisiyle.*

*(Qubit™ kullanılarak ölçülür, bkz. numune hazırlama kılavuzu ► bölüm 4.3 Numune miktar tayini (Qubit™))*

**Not:** Dilüsyon faktörü <1 ise İndeks eluatınızı dilüe etmeyip KK ölçümü, miktar tayini ve 2 nM dilüsyon için doğrudan kullanın.

**Buffer EB** [ $\mu\text{L}$ ] = (3 \* dilüsyon faktörü) – 3  $\mu\text{L}$

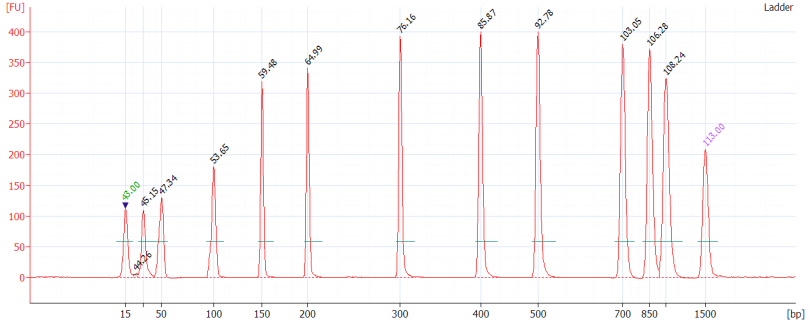
**BA\_DIL** [ $\mu\text{L}$ ] = 3  $\mu\text{L}$  İndeks eluatı + X  $\mu\text{L}$  Buffer EB

- İndeks eluatını hesaplamaya göre yeni bir tüpte dilüe edin. Kısa bir süre vorteksleyin ve 3 saniye boyunca döndürün. Kalan indeks eluatını 2 °C ila 8 °C sıcaklıkta 7 güne kadar, -15 °C ila -30 °C sıcaklıkta ise 2 aya kadar saklayın.

**Not:** En az 10  $\mu\text{L}$  toplam BA\_DIL hacmi mevcut bulunduğundan emin olun.

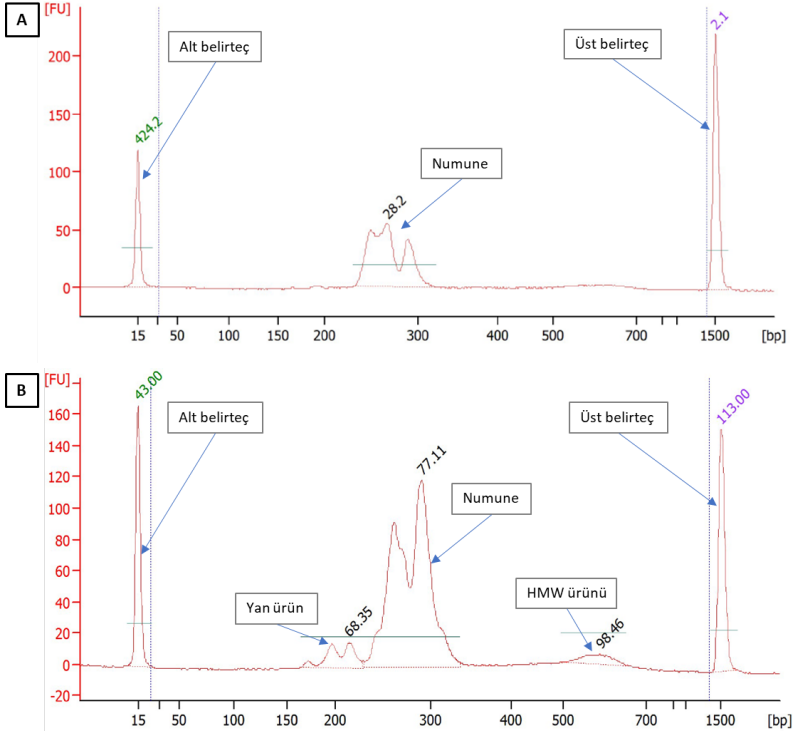
### Veri analizi:

- Merdiven grafiği profilinin aşağıda bulunan Şekil 8 şekline benzer görüldüğünü ve düz bir taban çizgisi ile en düşüğü 15 bp, en yükseği ise 1.500 bp olan (bunlar okunan her numune de bulunacak belirteçlerdir) 13 pik içerdığını doğrulayın (bkz. Şekil 8).



**Şekil 8: Merdiven elektroferogramı (Bioanalyzer)**


- Hazne 1'e ait elektroferograma çift tıklayıp Peak Table (Pik Tablosu) sekmesini seçin (bkz. Şekil 9).



**Şekil 9: Bioanalizer üzerindeki numune elektroferogramları. (A) Herhangi bir yan ürün içermeyen optimal elektroferogram, (B) yan ürünler içeren numune elektroferogramı (örneği primer dimer ve gDNA (HMW ürünü)).**

5. Elektroferograma sağ tıklayarak [Manual Integration] (Manuel Entegrasyon) ögesini seçin.
6. **Sıfır çizgisi boyunca** (Şekil 9B'de gösterilmiştir) numune ürünü, primer dimer (yan ürün) ve yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) ürün olmak üzere **tüm görsel pikleri** tanımlamak için mavi çizgileri kullanın.

**Not:** Mavi çizgilerin uçlarını kırmızı çizgiden ayırmak için "Ctrl" tuşunu kullanın. Bir çizgi seçiliyse şuna sağ tıklayarak onu kaldırın: [Remove Peak] (Piki Kaldır). [Add Peak] (Pik Ekle) ögesine sağ tıklayarak herhangi bir konuma ilave mavi çizgiler ekleyin.

7. [Peak Description] (Pik Tanımı) ögesini kullanarak (  ) her pik için ilgili molariteyi göstermek üzere [Mol Peak Molarity] (Mol Pik Molaritesi) ögesini seçin.
8. Dosyayı kaydedin.
9. Her bir replikanın kalan hazneleri için 4 ile 8 arasındaki adımları tekrarlayın.
10. Üçlü ölçüme dayalı olarak tüm ürünlerin molarite toplamının ortalamasını, standart sapmasını ve varyasyon katsayısını (CV) hesaplayın.

Kabul ve ret kriterleri:

- **DNA kalite kontrolü:** Ürün, primer dimer ve HMW toplamı < 2,0 nmol/l ise DNA konsantrasyonu dizileme için çok düşüktür.
- **Sinyal/Gürültü oranı (SNR) kabul kriteri:** ≥ % 90

$$SNR [\%] = \frac{\text{spesifik ürünün molaritesi}}{\text{spesifik ürün, yan ürün ve HMW ürünü toplamı}} * 100$$

- **Hassasiyet kontrolü** kabul kriteri: Tüm ürünlerin molarite toplamının CV'si ≤ % 10

$$\text{Varyasyon Katsayısı} [\%] = \frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama}} * 100$$

**Not:** Standart sapmayı numune bazında değerlendirin.

**Not:** Sinyal/Gürültü oranı spesifik olmayan bir pik nedeniyle başarısız oluyorsa bu değer hesaplamalardan çıkarılabilir.

**Not:** Üç replikanın CV'si > % 10 ise diğer iki değer kabul kriterleri dahilinde olduğu sürece en düşük değer numune hesaplamalarından çıkarılabilir.

**Not:** Bir veya daha fazla kriter başarısız olursa yeni bir BA\_DIL hazırlayıp Bioanalyzer çalıştırmasını tekrarlayın.

## 9.6 Illumina NextSeq™ 500/550'de dizileme

Numunelerin dizilenmesi Illumina NextSeq™ 500 veya 550 kullanılarak Illumina tarafından sağlanan kullanım talimatlarında açıklandığı şekilde gerçekleştirilir.

Gerekli kitler ve reaktifler:

- **NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Döngü)**, Illumina, #20024904  
≤ 377 ng toplam DNA girdisi (Numune hazırlama kılavuzu ► bölüm 4.3 *Numune miktar tayini (Qubit™)* içinde bulunan Qubit™ ölçümüne göre) VEYA
- **NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Döngü)**, Illumina, #20024907  
≤ 1.304 ng toplam DNA girdisi (Numune hazırlama kılavuzu ► bölüm 4.3 *Numune miktar tayini (Qubit™)* içinde bulunan Qubit™ ölçümüne göre)
- **Sodyum hidroksit (NaOH)**, 1 M
- **Trizma® hidroklorür solüsyonu** pH 7,0, 1 M
- **Buffer EB** (Elüsyon Buffer'ı), QIAGEN, #19086
- **Ribonükleaz ve deoksiribonükleaz içermeyen distile su**

Aşağıdaki adımlar PCR sonrası laboratuvarında gerçekleştirilir.

Dizileme için numune hazırlama (2 nM başlangıç kütüphane konsantrasyonu):

1. Her 2 nM kütüphane için gereken toplam hacmi hesaplayın:

$$\text{Toplam Hacim} [\mu\text{L}] = \frac{3 \mu\text{L } BA\_DIL * \text{Konsantrasyon}_{\text{Kütüphane}} \text{ cinsi } nM}{2 nM}$$

2. Gerekli **Buffer EB** hacmini hesaplayın:

$$\text{Hacim}_{\text{Buffer EB}} [\mu\text{L}] = \text{Toplam hacim} - 3 \mu\text{L } BA\_DIL$$

3. Aşağıdaki hesaplama göre her kütüphane için 2 nM kütüphane dilüsyonu hazırlayın:

**2 nM Kütüphane Dilüsyon** = 3 µl BA\_DIL + Hacim<sub>Buffer EB</sub>

**Not:** < 3 µl pipetlemeyin.

**Not:** 2 nM dilüsyon hacmi < 10 µl ise toplam hacmi ayarlayın.

4. *Opsiyonel:* Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit kullanılarak iki plaka işlendiyse iki ayrı 2 nM kütüphane dilüsyonunu aşağıdaki denklemlere göre 10 µl'lik nihai Kütüphane Havuzu Karışımında havuzlayın:

$$DNA\ girdisi_{toplam} = \sum DNA\ girdisi_{plakaA} + \sum DNA\ girdisi_{plakaB}$$

$$Hacim_{plakaA} = \frac{10\ \mu l}{DNA\ girdisi_{toplam}} * DNA\ girdisi_{plakaA}$$

$$Hacim_{plakaB} = \frac{10\ \mu l}{DNA\ girdisi_{toplam}} * DNA\ girdisi_{plakaB}$$

**Not:** Yalnızca mevcut pipetlerin kabul edilen aralıklarındaki hacimleri pipetleyin. Daha düşük hacimlerin pipetlenmesi gerekiyorsa bunun yerine nihai Kütüphane Havuzu Karışımının toplam hacmini artırın.

5. Yeni hazırlanmış 0,2 M NaOH ile (havuzlanmış) kütüphane denatürasyonu gerçekleştirin (bkz. Tablo 20). 5 saniye boyunca vorteksleyip 3 saniye boyunca santrifüjleyin.

**Tablo 20: Kütüphane denatürasyonu ve dilüsyonu için gereken hacimler.**

Kütüphane	0,2 M NaOH	0,2 M Tris-HCl	HT1 buffer
10 µl	10 µl	10 µl	970 µl

6. (Havuzlanmış) kütüphaneyi 15 °C ila 25 °C'de 5 dakika boyunca inkübe edin.
7. Denatüre (havuzlanmış) kütüphaneye 10 µl 0,2 M Tris-HCl, pH 7,0 ekleyin (bkz. Tablo 20). 5 saniye boyunca vorteksleyip 3 saniye boyunca döndürün.

8. Önceden soğutulmuş HT1 buffer'ından 970 µl ekleme yaparak denatüre (havuzlanmış) kütüphaneyi 20 pM'ye dilüe edin (Illumina Sequencing kitiyle birlikte verilir, bkz. Tablo 20). 5 saniye boyunca vorteksleyip 3 saniye boyunca döndürün.
9. Denatüre (havuzlanmış) 20 pM kütüphaneyi HT1 buffer'ıyla yeni bir tüpte, seçilen dizileme kitine ve dizileme cihazına bağlı olarak optimum nihai yükleme konsantrasyonuna kadar dilüe edin (bkz. Tablo 21). 5 saniye boyunca vorteksleyip 3 saniye boyunca döndürün.

**Önemli:** Her dizileme cihazı farklı bir optimum nihai yükleme konsantrasyonuna sahip olabildiğinden bunun kullanıcı tarafından belirlenmesi gerekir. Tablo 21 üzerinde belirtildiği şekilde önerilen nihai yükleme konsantrasyonumuzu kullanarak başlayın. Yükleme konsantrasyonunu küme yoğunluğu düşükse artırın, çalıştırmalar aşırı kümelenmişse azaltın.

**Tablo 21: Dizileme için önerilen nihai yükleme konsantrasyonu için gereken hacimler**

	Mid Output Kit	High Output Kit
Önerilen nihai konsantrasyon	1,0 pM	1,1 pM
Kütüphane girdisi	65 µl	71 µl
HT1 buffer	1.235 µl	1.229 µl

10. Dizileme bölgesinde ayrı bir demultipleksleme işlem hattı uygulanmışsa dizileme çalıştırmasını NextSeq Control kullanarak başlatın (örneğin Illumina'dan bcl2fastq). Aksi takdirde dizileme çalıştırmasını başlatmak için NextSeq cihazının Local Run Manager'ını kullanın.
11. Dizileme çalıştırmasının başlangıcını Illumina protokolüne (NextSeq™ 550 Sistem Kılavuzu, belge #15069765v06) göre Tablo 22 içinde bulunan aşağıdaki Run Parameter Settings'i (Çalıştırma Parametresi Ayarları) kullanarak gerçekleştirin:

**Tablo 22: Dizileme parametreleri**

Okuma türü	Tek okuma		
	Okuma 1	İndeks 1	İndeks 2*
Okuma uzunluğu	148	10	10

\* İndeks 2 okuma uzunluğu yalnızca aynı dizileme çalıştırmasında iki plaka kullanıldığında dahil edilecektir.

12. Local Run Manager'ı kullanırken "Advanced Module Settings"e (Gelişmiş Modül Ayarları) Tablo 23 üzerinde gösterilen aşağıdaki adaptör ayarlarını (numune sayfasından kopyalanabilir) ekleyin:

**Tablo 23: Local Run Manager için adaptör ayarları**

Adı	Dizi
Adaptör	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA

**Önemli:** Küme yoğunluğu,  $220 \text{ K/mm}^2$  değerini aşmamalıdır. Küme yoğunluğu  $> 220 \text{ K/mm}^2$  olduğunda dizileme çalıştırmasını azaltılmış yükleme konsantrasyonuyla tekrarlayın. Önerilen küme yoğunluğu aralığı  $150\text{-}220 \text{ K/mm}^2$ 'dir.

### Sonraki adımlar

Dizileme veri analizine devam etmek için Plasma-SeqSensei™ IVD Software IFU'suna (Data Analysis (Veri Analizi) modülü) bakın.



## 10 Teknik destek

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit'in iş akışı esnasında herhangi bir sorun meydana gelirse lütfen yardım için Sysmex yerel desteğinizle iletişime geçin.



**Not:** *Numune Hazırlama Kılavuzu'nun yanı sıra Plasma-SeqSensei™ IVD assay ve Plasma-SeqSensei™ IVD Software için Kullanım Talimatları farklı dillerde çevrimiçi olarak <https://sysmex-inostics.com/products/kit-specs/> adresinde mevcuttur.*

# 11 Performans özellikleri

## 11.1 Analitik duyarlılık

Tespit Limiti (LoD) değerlendirmesi, *CLSI EP17-A2* kılavuzunda belirtilen spesifikasyonlara göre gerçekleştirilmiştir.

Analiz; insersiyonları, delesyonları, substitüsyonları ve delesyon-insersiyonları içermiştir.

LoD'den türetilen sonlanım, 6 mutant molekül (MM) olmuştur.

Analit (MM)	% cinsinden isabet oranı (n=192)	LoD95
20	100	3,81 MM (CI95 3,25 MM – 4,65 MM)
10	100	
5	99,0	
2,5	87,0	
1,25	62,5	
0,625	41,7	

## 11.2 Analitik spesifiklik

Tasarım, olası çapraz reaktiviteye karşı BLAST analizi kullanılarak bilgisayar modellemesiyle kontrol edilmiş ve son derece spesifik olduğu teyit edilmiştir. Hedef dışı dizilere insan genomunun yanı sıra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, Sitomegalovirüs, Epstein-Barr Virüsü, HIV ve Hepatit-C Virüsü gibi kan yoluyla bulaşan tipik mikroorganizmaların/virüslerin kamuya açık DNA dizileri de dahil edilmiştir.

## 11.3 Kesinlik/tekrarlanabilirlik

Kesinlik değerlendirmesi, *CLSI EP05-A3* kılavuzunda belirtilen spesifikasyonlara göre gerçekleştirilmiştir.

Kalitatif kesinlik > % 99'dur.

Kantitatif tekrarlanabilirlik < % 10 (CV maks.), ara kesinlik ise  $\geq 20$  MM'de < % 15'dir.

Hedef MM	Tekrarlanabilirlik (% cinsinden CV maks.)	Ara kesinlik
500	2,54	13,84
100	5,99	13,10
50	7,76	14,15
20	5,65	14,02

## 11.4 Ölçüm aralığı/doğrusallık

DNA girdisinde doğrusal aralığın tespiti, *CLSI EP06-A* kılavuzunda belirtilen spesifikasyonlara göre gerçekleştirilmiştir.

Plasma-SeqSensei™ iş akışı, tahlil DNA'sı girdi aralığı (numune başına 4,3 ila 86 ng) içinde doğrusallık göstermektedir.

## 11.5 Enterferans maddeleri

Enterferans maddelerinin tespiti *CLSI EP07-A2* kılavuzunda belirtilen spesifikasyonlara göre gerçekleştirilmiştir.

Plasma-SeqSensei™ iş akışının, yaygın enterferans maddelerine karşı dayanıklı olduğu teyit edilmiştir. Hemoglobün ( $\leq 2$  g/l), bilirubin ( $\leq 200$  mg/l), trigliserit ( $\leq 15$  g/l), melanin ( $\leq 0,2$   $\mu$ g/l) ve etanol ( $\leq 86,8$  mmol/l) varlığının test geçerliliği ve sonuçları üzerinde etkisi yoktur.

## 11.6 Klinik performans ve karakteristik özellikler

Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD kitinin klinik performansı, tüm hedef genler için 76 pozitif ve 78 negatif numune test edilerek belirlenmiştir. Duyarlılık % 97 (% 95 CI: % 90,3 - % 99,3), spesifiklik ise % 95'dir (% 95 CI: % 87,5 - % 98).

## 11 Performans özellikleri

		Referans yöntemi: BC_P2 test		
		pozitif	negatif	toplam
Plasma- SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit	pozitif	74	4	78
	negatif	2	74	76
	toplam	76	78	154

Genel uyum yüzdesi % 96,1'tür.

### 11.7 Sınırlamalar

İzin verilen DNA girdisi aralığı sınırındaki numunelerin performans verileri belirtilen değerlerden sapabilir ve düşük konsantrasyonlu numunelerde daha düşük duyarlılık ve tekrarlanabilirlik, yüksek konsantrasyonlu numunelerde ise daha düşük LoD değerleri görülebilir.

## 12 Sözlük ve terimler dizgesi

Terim	Tanım
bp	Baz çifti
BA_DIL	Bioanalyzer dilüsyonu
BLAST	Temel yerel hizalama arama aracı
cfDNA	Hücre dışı DNA
CI	Güven aralığı
CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
COSMIC	Kanserde somatik mutasyonlar kataloğu
ctDNA	Dolaşımdaki tümör DNA'sı
CV	Varyasyon katsayısı
dbSNP	Tek nükleotid polimorfizm veri tabanı
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DNA	Desoksiribonükleik asit
EB	Elüsyon buffer'ı
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EtOH	Etanol
gDNA	Genomik DNA
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
HMW	Yüksek moleküler ağırlık
IDX	İndeks
IFU	Kullanım talimatları
LoD	Tespit limiti
MAF	Mutant alel fraksiyonu
MM	Mutant moleküller
Mpx	Multipleks primer karışımı

## 12 Sözlük ve terimler dizgesi

---

Terim	Tanım
NaOH	Sodyum hidroksit
NGS	Yeni Nesil Dizileme
NTC	No template control
PC	Pozitif kontrol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
QC	Kalite kontrolü
RNA	Ribonükleik asit
SNV	Tek nükleotid varyantı
UID	Benzersiz tanımlayıcı

## 13 Referanslar

- 1) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
- 2) Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018 Jul;13(3):339-354. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006. PMID: 30100074; PMCID: PMC6092031.
- 3) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 4) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.
- 5) Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019 Mar 18;17:100087. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100087. PMID: 30923679; PMCID: PMC6425120.
- 6) Fiste O, Lontos M, Koutsoukos K, Terpos E, Dimopoulos MA, Zagouri F. Circulating tumor DNA-based predictive biomarkers in breast cancer clinical trials: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2020 Dec;8(23):1603. doi: 10.21037/atm-20-1175. PMID: 33437802; PMCID: PMC7791253.
- 7) [Online] <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- 8) Keup C, Benyaa K, Hauch S, Sprenger-Haussels M, Tewes M, Mach P, Bittner AK, Kimmig R, Hahn P, Kasimir-Bauer S. Targeted deep sequencing revealed variants in cell-free DNA of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Feb;77(3):497-509. doi: 10.1007/s00018-019-03189-z. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31254045; PMCID: PMC7010653.
- 9) Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, Howarth K, Epstein M, Green E, Rosenfeld N, Ring A, Johnston S, Turner N. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2018 Jan 1;29(1):145-153. doi: 10.1093/annonc/mdx483. PMID: 29045530; PMCID: PMC6264798.

### 14 Telif hakları ve ticari markalar

Bu kılavuzdaki içeriğin tamamının veya bir kısmının, Sysmex Corporation, Japonya'nın önceden yazılı izni olmadan yetkisiz olarak çoğaltılması yasaktır.

Plasma-SeqSensei™; Sysmex Corporation, Japonya'nın ticari markasıdır.

Diğer tüm ticari markalar, isimler ve ürünler, özellikle bu şekilde işaretlenmiş olmasalar bile ilgili sahiplerinin ticari markaları veya tescilli ticari markalarıdır.



## 15 Revizyon geçmişi

Belge sürümü	Tarih	Deęiřiklik açıklaması	Kısım
R3	Aralık 2023	Bioanalizer kullanımı esnasında SNR ve CV hakkındaki notların güncellenmesi	9.5
R2	Kasım 2023	Germ hattı mutasyonlarına ilişin tespit limitlerinin güncellenmesi	6
		Amino asit kodlayan nükleotid ullerinin eksik kapsanmasının raporlanmasına ilişkin bilgiler	6
		Laboratuvar st sıcaklık sınırının düşürülmesi ve oda sıcaklığının belirtimi (15 °C ila 25 °C)	8.2 9
		IFU'lar, MSDS için indirme bağlantısının güncellenmesi	8.3 ve 10
		High Output kiri başında minimum numune sayısının eklenmesi	9
		Qubit™ ile numune dilüsyon önerisinin ve miktar tayininin güncellenmesi	9.1
		AMPure manyetik boncuk kullanımı hakkında bilgi	9.2 9.2 adımı 15 9.4 adımı 7
		Standart sapma ile ilgili notun eklenmesi	9.5 adımı 10
		Numune denatürasyonu, dilüsyon ve dizileme bařlatma hakkında geniřletilmiř bilgilerin eklenmesi	9.6 adımları 5 - 12
		Performans karakterizasyonu hakkında bilgi eklenmesi	11.1 11.6 11.7
		Revizyon geçmişi tablosunun eklenmesi	15
		Küçük düzeltmeler, imla, mizanpaj ve düzen deęiřiklikleri	
R1	Haziran 2022	Yok	







Aralık 2023  
ZR150547.R3

Sysmex Inostics GmbH  
Falkenried 88  
20251 Hamburg, Almanya  
[www.sysmex-inostics.com](http://www.sysmex-inostics.com)

© 2023 Sysmex Inostics  
Tüm hakları saklıdır.

