

Haziran 2018

# *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 MbcR RGGQ RT-PCR Kit El Kitabı



Sürüm 1

**IVD**

Kantitatif in vitro tanı amaçlı

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM cihazı ile kullanım içindir

**CE**

**REF**

670923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
ALMANYA

R4

**MAT**

1114278TR

# İçindekiler

Kullanım Amacı .....	5
Özet ve Açıklama .....	5
Kronik miyeloid lösemi hakkında ön bilgiler.....	5
Hastalık seyrinin izlenmesi .....	6
Prosedür Prensipleri .....	8
Sağlanan Materyaller.....	11
Kit içeriği.....	11
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller .....	12
Uyarılar ve Önlemler.....	15
Güvenlik bilgileri .....	15
Genel önlemler.....	15
Reaktif Saklama ve Kullanma.....	17
Sevkiyat koşulları .....	17
Saklama koşulları .....	18
Stabilite .....	18
Numune Kullanımı ve Saklama .....	19
Tam kan örnekleri .....	19
RNA örnekleri.....	19
Prosedür .....	20
Tam kandan total lökosit izolasyonu için eritrosit lizis protokolü.....	20
Total RNA izolasyonu.....	22
RNA'da kalite ve miktar tayini.....	25

RNA konsantrasyonu .....	25
Ters Transkripsiyon.....	28
Manuel analiz: RGQ yazılımı ile 72 tüplük rotora sahip Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında qPCR .....	31
Otomatik analiz: RGAM yazılımı ile 72 tüplük rotora sahip Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında qPCR .....	37
Sonuçların RGQ Yazılımında Yorumlanması .....	48
Veri analiz prensibi.....	48
Ham veriler için geçerli standart eğrileri ve kalite kriterleri.....	49
Sonuçların RGAM Yazılımında Yorumlanması.....	57
Sorun Giderme Kılavuzu .....	63
Kalite Kontrol .....	65
Sınırlamalar .....	65
Performans Özellikleri .....	67
Boş örnek sınırı .....	67
Tespit sınırı .....	67
Doğrusallık .....	67
Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik .....	68
Engelleyici maddeler .....	68
Klinik doğrulama ve yöntemlerin karşılaştırılması .....	69
Uyumluluk çalışması: ERM-AD623 BCR-ABL1 tekli plazmid (IRMM) ile <i>ipsogen</i> tekli plazmid (QIAGEN) standartlarının karşılaştırılması .....	71
Referanslar.....	73
Semboller .....	75
Sipariş Bilgileri.....	76

---

El Kitabı Revizyon Geçmişi .....	78
----------------------------------	----

# Kullanım Amacı

*ipsogen* BCR-ABL1 M<sub>bcr</sub> RGQ RT-PCR Kit, tam kandan ekstrakte edilen total RNA'daki BCR-ABL1 füzyon geni b3a2 (e14a2) ve b2a2 (e13a2) transkriptlerinin ölçülmesi için uygulanan kantitatif in vitro tanı amaçlı bir testtir.

*ipsogen* BCR-ABL1 M<sub>bcr</sub> RGQ RT-PCR Kit, kronik faz Philadelphia kromozomlu pozitif (Ph+) p210 kronik miyeloid lösemi (KML) tanısı konan hastalarda derin moleküler yanıtın izlenmesine yöneliktir.

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) Uluslararası Genetik Referans Paneli ile karşılaştırılarak kalibre edilmiştir.

## Özet ve Açıklama

### Kronik miyeloid lösemi hakkında ön bilgiler

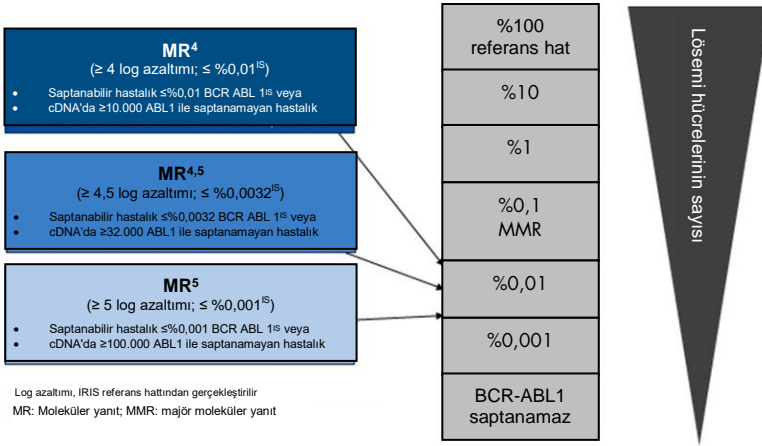
KML, miyeloproliferatif neoplazmlar grubuna dahildir ve Philadelphia kromozomunun (Philadelphia chromosome, Ph CHRS) varlığı ile karakterize edilen vakaların > %90'ında görülür. Bu kromozom, 22 numaralı kromozomda sınır küme bölgesi (BCR) ve 9 numaralı kromozomda c-ABL onkojeni bulunduğu, 9 ve 22 numaralı kromozomlardaki, t(9;22) uzun kolların karşılıklı translokasyonu sonucu oluşur. Karşılık gelen füzyon geni BCR-ABL1, b2a2 (vakaların %40'ında görülür) ve b3a2 (vakaların %55'inde görülür) olmak üzere 2 kesişim varyantı ile birlikte bir 8,5 kb mRNA içine kopyalanır. Bu füzyon geni, artmış tirozin kinaz aktivitesine sahip kimerik bir protein (p210) kodlar. b2a3 ve b3a3 transkriptleri, vakaların %5'inden azını temsil etmektedir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) görülen yetişkin hastaların %35'inde Ph kromozomu saptanabilir.

KML'nin yıllık görölme oranı 100.000'de 1-2'dir ve KML tüm yetişkin lösemi vakalarının %20'sini oluşturmaktadır. Klinik olarak, normal şekilde farklılaşan ve işlev gören miyeloid hücrelerinin fazla olmasıyla karakterizedir. KML vakalarının %90–95'inde hastalara kronik veya stabil fazda tanı koyulur. Geçmişte, tanılama öncesinde hastalar blast krizine ve akut lösemiye doğru ilerlemekte ve ortalama 4 ila 6 yıl içinde ölmekteydi. İmatinib kullanımının başlaması ve daha yakın zamanda ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ) piyasaya çıkması ile birlikte, hastalığın doğal seyri önemli ölçüde değişmiştir. Artık birçok hasta remisyonda kalmakta, uzun vadeli takip ve hastalık seyrinin izlenmesi yardımıyla hayatına devam etmektedir.

## Hastalık seyrinin izlenmesi

KML tedavisinin şu anki hedefi, %100 hayatta kalma oranı ve Ph kromozomu negativitesi elde etmektir. Bu nedenle hastalığın seyrinin izlenmesi, tedaviye verilen yanıtı değerlendirmek ve hastalarda nüksetme belirtilerini mümkün olduğunca erken saptamak adına önemli bir araçtır. TKİ'lerle tedavi edilen hastalar, tipik olarak önce hematolojik, sonra sitogenetik ve ardından moleküler remisyona geçmektedir; buna karşılık olarak da lösemi hücrelerinin ve BCR-ABL1 transkriptlerinin sayısında da şekil 1 üzerinde gösterildiği şekilde azalma meydana gelmektedir.

## Uluslararası ölçek



**Şekil 1. Moleküler yanıtın tanımı.** 1, 2 ve 9 numaralı referanslardan uyarlanmıştır. MR: moleküler yanıt. MMR: majör moleküler yanıt.

KML hastalarında tümör yükünü tahmin etmede kullanılan referans metot, kemik iliği (bone marrow, BM) metafazları üzerinde yapılan geleneksel sitogenetik analizdir (G bantlama). Sitogenetik yanıt, en az 20 adet ilik metafazı üzerinden değerlendirilir. Sitogenetik yanıtın seviyesi, Ph kromozomu pozitif metafazların yüzdesine dayalı olarak tahmin edilir (3). Bununla birlikte bu değerlendirme, laboratuvar performansları ve uzmanlığından etkilenmekte olup 20 metafazın analiz edildiği durumda, %5 oranında düşük bir hassasiyete sahiptir.

Periferik kan (peripheral blood, PB) örneklerindeki BCR-ABL1 Mbcr mRNA üzerinde yapılan gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) miktar tayini, moleküler yanıtı verir; bu da, KML'de kullanılan hastalık seyri izleme tekniklerinin bir kısmıdır. Geleneksel kemik iliği metafaz sitogenetiğinden daha az invazif ve daha hassastır.

KML hastalık seyri izleme önerileri de ilaç deneylerinden, ikinci nesil TKI'lerin daha yüksek klinik etkinliğinden ve BCR-ABL1 miktar tayinindeki teknik gelişmelerden elde edilen yeni klinik bulguları içine alacak şekilde güncellenmiştir; tüm bunlar da hastalık seyrinin izlenmesi ile ilgili hedefleri yükselmiştir. Spesifik olarak, ikinci nesil TKI'ler daha fazla KML hastasında daha belirgin moleküler yanıt alınmasını sağlamıştır. Bu, derin moleküler yanıt olarak tanımlanmakta ve %0,01 (MR4,0) veya %0,0032 (MR4,5) değerlerinin altında bir BCR-ABL1 yüküne karşılık gelmektedir. Kesintisiz MR4,5 moleküler yanıt veren hastalarda TKI kullanımının güvenle kesilebileceğini ortaya koyan gözlemsel deneylerin gösterdiği gibi, bu oldukça düşük BCR-ABL1 yükü düzeylerinde doğru şekilde miktar tayini yapabilmek klinik açıdan önem taşıyor olabilir (4). Ancak bu bulguları teyit etmek amacıyla ilave klinik deneyler yapılması planlanmaktadır.

Yanıt tanımlama ve TKI kullanan KML hastalarının takibi hakkındaki en yeni öneriler, ELN uzmanlarından gelmektedir (3).

Teknik açıdan bakıldığında, BCR-ABL1 MbcR testlerini ve rapor alma sürecini uyumlandırmak için uluslararası uzmanlar çaba göstermektedir (5-7). Ek olarak, BCR-ABL1 miktar tayininde basit bir standardizasyon sağlanması için WHO himayesinde bir referans panel doğrulanmıştır (8).

## Prosedür Prensipleri

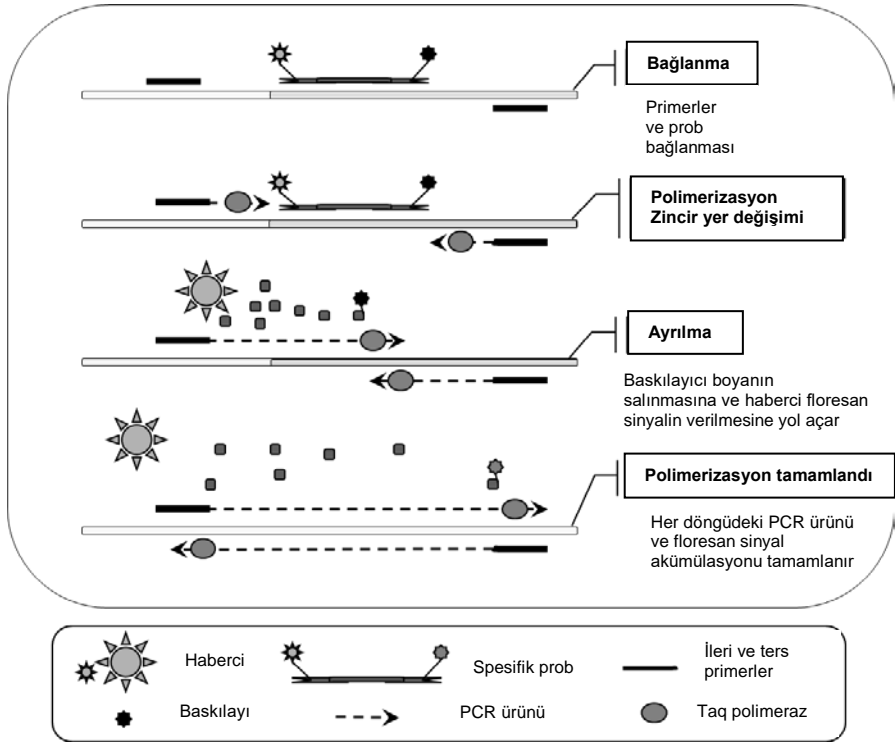
qPCR kullanılması, PCR amplifikasyon sürecinin eksponensiyel fazı sırasında PCR ürünlerinin doğru kantifikasyonunu mümkün kılar. qPCR verileri, PCR sonrası işleme yapılmaksızın, PCR döngüsü esnasında ve/veya sonrasında gerçek zamanlı floresan sinyal algılama yoluyla PCR verilerinin hızlıca elde edilmesini sağlar ve bu sayede PCR ürün kontaminasyonu riskini önemli ölçüde azaltır. An itibarıyla üç temel qPCR tekniği mevcuttur: SYBR® Green I Dye kullanan qPCR analizi, hidroliz problemleri kullanan qPCR analizi ve hibridizasyon problemleri kullanan qPCR analizi.



Bu test qPCR çift boyalı oligonükleotid hidroliz prensibini kullanmaktadır. PCR esnasında, ileri ve ters primerler belirli bir sırada hibridize olur. Bu karışıma çift boyalı oligonükleotid dahil edilir. 5' haberci boya ve aşağı yönde 3' baskılayıcı boya ile etiketlenen oligonükleotidden oluşan bu prob, PCR ürünü içinde hedeflenen sıralamaya göre hibridize olur. Hidroliz probu qPCR analizi, *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerazının 5'→3' ekzonükleaz etkinliğini kullanır. Bu prob intakt durumda iken, haberci boyanın baskılayıcı boyaya olan yakınlığı, haberci boyanın birincil olarak Förster tipi enerji transferi tarafından baskılanmasına yol açar.

PCR esnasında, ilgilenilen hedef mevcutsa, prob, ileri ve ters primer alanlarını spesifik olarak bağlar. Yalnızca probun hedefe hibridize olması durumunda, DNA polimerazının 5'→3' ekzonükleaz etkinliği, haberci boya ile baskılayıcı boya arasındaki probu ayırır. Ardından prob parçaları hedeften ayrılır ve zincirin polimerizasyonu devam eder. PCR esnasında probun uzamasını önlemek için probun 3' ucu bloke edilir (şekil 2). Süreç her yeni döngüde tekrarlanır ve ürünün eksponensiyel akümülyasyonuna engel olmaz.

Floresan sinyaldeki artış, yalnızca hedef sıralamanın probu tamamlayıcı nitelikte olması ve bu sayede PCR esnasında amplifiye edilmesi durumunda algılanır. Bu gereklilikler nedeniyle spesifik olmayan amplifikasyon saptanmaz. Yani, floresan artışı, PCR esnasındaki hedef amplifikasyonu ile doğru orantılıdır.



**Şekil 2. Reaksiyon prensibi.** Total RNA için ters transkripsiyon işlemi yapılır ve ortaya çıkan cDNA, bir spesifik primerden ve bir spesifik dahili çift boyalı probdan oluşan bir çift kullanılarak PCR tarafından amplifiye edilir (FAM™–BHQ®-1). Prob, PCR işleminin her bağlama adımında ampikona bağlanır. Taq, ampikona bağlı primerden uzayarak çıktığında, probun 5' ucunu yerinden çıkarır ve ardından bu uç, Taq DNA polimerazının 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi ile parçalanır. Probun kalanı ampikonu eriterek bitirinceye kadar ayrılma devam eder. Bu işlem florofor ve söndürücüyü solüsyona serbest bırakır, bunları uzaysal olarak ayırır ve FAM'dan floresans artmasına ve BHQ-1'den floresans azalmasına neden olur.

# Sağlanan Materyaller

## Kit içeriği

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit		(24)
<b>Katalog no.</b>		<b>670923</b>
<b>Reaksiyon sayısı</b>		<b>24</b>
<b>Reagents for reverse transcription (Ters transkripsiyon (RT) reaktifleri)</b>		24 µl
Reverse transcriptase (Ters transkriptaz)	Mor	100 µl
RT Mix (RT Karışımı)	Mor	300 µl
<b>Kalibrasyon reaktifleri</b>		
High Positive RNA Control (Yüksek Pozitif RNA Kontrolü)	Beyaz	15 µl x 3
Low Positive RNA Control (Düşük Pozitif RNA Kontrolü)	Beyaz	15 µl x 3
IS-MMR Calibrator (IS-MMR Kalibratör)	Beyaz	15 µl x 3
SP1-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>1</sup> kopya/5 µl)	Sarı	35 µl
SP2-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>2</sup> kopya/5 µl)	Sarı	35 µl
SP3-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>3</sup> kopya/5 µl)	Sarı	70 µl
SP4-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>4</sup> kopya/5 µl)	Sarı	35 µl
SP5-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>5</sup> kopya/5 µl)	Sarı	70 µl
SP6-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>6</sup> kopya/5 µl)	Sarı	70 µl

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

qPCR reaktifleri		
Taq DNA polymerase (Taq DNA polimeraz)	Nane Yeşili	85 µl
qPCR Mix ABL1 (qPCR Karışımı ABL1)*	Yeşil	720 µl x 3
qPCR Mix Mbcr (qPCR Karışımı Mbcr)†	Kırmızı	720 µl x 3
ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit El Kitabı		1

\* ABL1 kontrol geni için ters ve ileri spesifik primerlerin bir karışımına ek olarak spesifik FAM-BHQ-1 probu içerir.

† BCR-ABL1 Mbcr füzyon geni için ters ve ileri spesifik primerlerin bir karışımına ek olarak spesifik FAM-BHQ-1 probu içerir.

## Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (safety data sheets, SDS'ler) başvurun.

### Eritrosit lizis reaktifleri

- Erythrocyte Lysis (EL) Buffer (kat. no. 79217)
- 14,3 M β-merkaptetoetanol\*
- RNeasy® Midi Kit (kat. no. 75144)

### Total RNA izolasyonu reaktifleri

- RNeasy Midi Kit (kat. no. 75144)

\* Eritrosit lizis ve RNA izolasyonu için önerilen kimyasallar ve ekipman potansiyel olarak tehlikelidir. Kullanım öncesinde uygun kişisel koruma ekipmanlarının kullanıldığından ve koruyucu önlemlerin alındığından emin olun.

- Etanol (%70, %80 ve %96–100)
- RNA temizleme ve konsantrasyon adımı: RNeasy MinElute® Cleanup Kit (kat. no. 74204)
- Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su

## Sarf malzemeleri

- Nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril hidrofobik filtrelili PCR pipeti uçları
- 18–20 ölçüm iğnesi\*; RNaz içermeyen şırıngaya takılı
- 0,5 ml veya 0,2 ml nükleaz içermeyen tüp
- 1,5 ml veya 2 ml nükleaz içermeyen tüp
- 50 ml santrifüj tüpü
- Strip Tubes and Caps 0.1 ml for the Rotor-Gene Q (kat. nos. 981103 veya 981106)
- Buz

## Ekipman

- PCR için ayrılmış pipetler\* (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1.000 µl)
- 0,2 ml ve 2 ml'lik reaksiyon tüpleri için rotora sahip masaüstü santrifüj\* (8000 x g veya 10.000 rpm'ye ulaşma özelliğinde)
- Spektrofotometre\*
- Soğutmalı santrifüjleme (4°C) yapılmasını sağlayan, 15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri için rotora sahip laboratuvar santrifüjü\* (3.000–5.000 x g hıza ulaşma özelliğinde)
- Termomikser, ısıtmalı orbital inkübatör, ısıtma bloku veya su banyosu (ters transkripsiyon adımı için)\*

\* Cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\* (kat. no. 9002032) ve ilgili spesifik materyal  
Not: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, ters transkripsiyon adımı için kullanılamaz.

## **Manuel analiz ile qPCR için ekipman**

### **Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.1.0 veya üzeri Otomatik analiz ile qPCR için ekipman**

- Rotor-Gene AssayManager® yazılım sürümü 2.1.x (x≥0)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0.x (x≥0)
- Test Profili ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE\_V1\_0\_x.iap (x≥1)

# Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir

## Güvenlik bilgileri

Kimyasallarla çalışırken, daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN® kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) adresinde çevrimiçi olarak pratik ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

Tüm kimyasallar ve biyolojik materyaller potansiyel olarak tehlikeli maddedir. Numuneler ve örnekler potansiyel olarak bulaşıcıdır ve bunlara biyotehlikeli madde olarak davranılmalıdır. Kan, potansiyel enfeksiyöz madde olarak kabul edilir. Tam kanla çalışırken, bulunduğunuz ülkenin ilgili düzenleyici mercileri tarafından önerilen tüm gerekli önlemleri alın.

Eritrosit lizis ve RNA izolasyonu için önerilen kimyasallar ve ekipman potansiyel olarak tehlikelidir. Kullanım öncesinde uygun kişisel koruma ekipmanlarının kullanıldığından ve koruyucu önlemlerin alındığından emin olun.

## Genel önlemler

qPCR testlerinin kullanımı ekipmanların bakımı dahil olmak üzere, moleküler biyolojiye özel ve yürürlükteki yönetmeliklere ve ilgili standartlara uygun iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir. Bu ürünün bileşenleri, her bir test için 24 reaksiyon gerçekleştirilmeye yeterlidir.

- Örneği ve test atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.
- *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit ile birlikte verilen reaktifler optimum ölçüde seyreltilmiştir. Performans kaybı yaşanabileceği için reaktifleri daha fazla seyreltmeyin.

- *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit içinde tedarik edilmiş tüm reaktifler, yalnızca aynı kit ile tedarik edilen reaktiflerle birlikte kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Performans kaybı yaşanabileceği için *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit'ler arasında reaktifleri değiştirerek kullanmayın.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı, Rotor-Gene AssayManager v2.1 ve Gamma plug-in kullanım kılavuzlarına bakın.
- İnkübasyon sürelerinin ve/veya sıcaklıkların değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilere neden olabilir.
- Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.
- Pozitif Kontrolleri kullanırken, çapraz kontaminasyonu engellemek amacıyla son derece dikkatli olun.
- Yanlış pozitif sinyale neden olabilecek cDNA veya PCR ürünü aktarma kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.
- RNA veya cDNA şablonlarının bozulmasına yol açabilecek RNaz veya DNaz kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.
- İşlem bitmeden Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazını açmayın.
- Doğru örnek testi yapabilmek için yanlış örnek girişi, yükleme hatası ve pipetleme hatası gibi durumlara karşı dikkatli olunmalıdır.
- Doğru tanımlama yapabilmek ve bu sayede sürekli izlenebilirlik sağlamak amacıyla örneklerin sistematik bir şekilde kullanıldığından emin olun.

Bu nedenle aşağıdakileri öneririz:

- Nükleaz içermeyen laboratuvar ekipmanı kullanın (örn. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri)
- Örneklerin ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek için tüm pipetleme adımları için yeni aerosole dirençli pipet uçları kullanın.



- Ön-PCR ana karışımlarını hiçbir DNA matrisinin (cDNA, plazmid veya PCR ürünü) içeri sokulmadığı ayrılmış bir alanda özel malzemeler (pipetler, uçlar vb.) kullanarak hazırlayın.
- Şablonu ayrı bir bölgede (tercihen farklı bir odada) özel materyaller (pipetler, uçlar vb.) kullanarak ekleyin.

Örnek hazırlamada kullanılan reaktiflere ve kitlelere özel güvenlik bilgileri için ilgili el kitaplarına başvurun. RNeasy Midi Kit (kat. no. 75144) için güvenlik bilgileri, Buffer EL (kat. no. 79217) ile ilişkilendirilmiş olarak *RNeasy Midi/Maxi El Kitabı* (RNeasy Midi/Maxi Handbook) içinde verilmektedir. RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. no. 74204) için güvenlik bilgileri ise *RNeasy MinElute Temizlik El Kitabı* (RNeasy MinElute Cleanup Handbook) içinde verilmektedir.

## Reaktif Saklama ve Kullanma

### Sevkiyat koşulları

*ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit, kuru buz üzerinde taşınır ve teslim edilir. Teslimat esnasında *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit'in herhangi bir bileşenin donmuş olmadığını, dış ambalajın nakliye esnasında açılmış olduğunu veya paket içinde ambalaj notu veya reaktiflerin bulunmadığını fark ederseniz lütfen QIAGEN Teknik Servis Departmanı ile veya yerel distribütörlerle irtibata geçin (arka kapağa bakın veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret edin).

## Saklama koşulları

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kiti teslim alınmasından hemen sonra  $-30^{\circ}\text{C}$  ila  $-15^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta sabit sıcaklıklı bir dondurucuda saklanmalıdır. qPCR karışımları ışığa maruz bırakılmamalıdır.

Örnek hazırlamada kullanılan reaktiflerle ve kitlerle ilgili saklama bilgileri için: RNeasy Midi Kit (kat. no. 75144), Buffer EL (kat. no. 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. no. 74204), ilgili el kitaplarına başvurun.

## Stabilite

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit, belirtilen saklama koşullarında saklandığı zaman belirtilen son kullanma tarihine kadar stabil kalır.

Bir kez açıldığında, reaktifler  $-30^{\circ}\text{C}$  ila  $-15^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta orijinal ambalajı içinde saklanırsa ambalaj üzerindeki son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. En fazla beş kez çözdürüp dondurmanız tavsiye edilir.

Örnek hazırlamada kullanılan reaktif ve kitlerle ilgili stabilite bilgileri için: RNeasy Midi Kit (kat. no. 75144), Buffer EL (kat. no. 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. no. 74204), ilgili el kitaplarına başvurun.

# Numune Kullanımı ve Saklama

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit, tam kandan elde edilen RNA örnekleri ile birlikte kullanım içindir. Tüm örnekler tehlikeli olabileceği düşünülerek muamele yapılmalıdır.

## Tam kan örnekleri

- Tam kan örnekleri potasyum EDTA (K<sub>2</sub>EDTA) ile antikoagüle edilmeli ve RNA ekstraksiyonundan önce 4 günden fazla olmamak üzere 2–8°C'de saklanmalıdır.
- Donmuş kan kullanmayın.
- Kan örneklerini kontrollü bir şekilde, yerel prosedürlere uygun olarak etiketleyin, kullanın ve saklayın.

Not: Tam kan örneklerinin sevkıyatı, sıcaklık değişimlerinden korumak amacıyla saklama koşullarında yapılmalıdır.

## RNA örnekleri

- Uzun süre saklanması gereken saflaştırılmış RNA, izolasyon sonrasında –30°C ile –15°C arasında veya daha düşük sıcaklıkta (–90°C ila –65°C) saklanabilir.
- RNA örneklerini kontrollü bir şekilde, yerel prosedürlere uygun olarak etiketleyin, kullanın ve saklayın.

Not: RNA örneklerinin sevkıyatı, sıcaklık değişimlerinden korumak amacıyla saklama koşullarında yapılmalıdır.

# Prosedür

Total RNA, EDTA tüpünde toplanan 10 ml periferel tam kandan saflaştırılarak elde edilmelidir.

- Eritrosit lizis, RNA izolasyonu ve RNA konsantrasyonu için kullanılan reaktiflerin son kullanma tarihinin geçmemiş olduğundan ve uygun koşullarda sevk edildiğinden ve saklandığından emin olun.
- Periferel tam kandan RNA saflaştırmada, RNeasy Midi Kit (kat. no. 75144) ve eritrosit lizis için Buffer EL (kat. no. 79217) kullanın.

## Tam kandan total lökosit izolasyonu için eritrosit lizis protokolü

Bu protokol, Buffer EL (kat. no. 79217) kullanarak 10 ml insan tam kanından total lökosit izolasyonu yapmak için tasarlanmıştır.

Not: Bu protokol, donmuş tam kan örneklerinin kullanımı için tasarlanmamıştır.

### Başlamadan önce önemli notlar

- Tüm insan deneklerden alınan kan ve vücut sıvıları hastalık taşıyor olabilir. Tam kanla çalışırken, bulunduğunuz ülkenin ilgili düzenleyici mercileri tarafından önerilen tüm gerekli önlemleri alın.
- Buffer RLT saklama sonrasında çökelti oluşturabilir. Gerekirse ısıtarak çözün ve ardından oda sıcaklığında tutun.
- Eritrosit lizis adımı buz üzerinde gerçekleştirilmelidir.
- Bu protokoldeki 3 ve 5 numaralı santrifüjleme adımları, standart laboratuvar santrifüjünde 4°C sıcaklıkta gerçekleştirilmelidir.

## Başlamadan önce yapılması gerekenler

- $\beta$ Merkaptoetanol ( $\beta$ -ME) ekleyerek Buffer RLT (RNeasy Midi Kit ile birlikte verilir) hazırlayın. 1 ml Buffer RLT başına 10  $\mu$ l  $\beta$ -ME ekleyin.
- Buffer RLT,  $\beta$ ME eklendikten sonra 1 ay stabil kalır.  
Not:  $\beta$ -ME zehirlidir; davlumbaz altında dağıtım yapın ve işlem esnasında uygun koruma ekipmanını kullanın.  
Not: Tampon RLT, ağartıcı ile karıştırıldığında yüksek oranda reaktif bileşikler oluşturabilen guanidin izotiyosiyanat içerir. Örnek hazırlama atıklarına doğrudan ağartıcı veya asidik çözeltiler eklemeyin.

## Prosedür

1. Tekli 50 ml santrifüj tüpü içinde 10 ml tam kana 40 ml Buffer EL ekleyin. Kısa süreyle baş aşağı çevirerek karıştırın.
2. Buz üzerinde 15 dakika inkübe edin. İnkübasyon sırasında iki defa kısa süreyle baş aşağı çevirerek karıştırın.  
Not: Bulanık süspansiyon, inkübasyon esnasında yarı saydam hale gelir; bu, kırmızı kan hücrelerinin parçalandığını gösterir.
3. 4°C sıcaklıkta 10 dakika boyunca 400 × g hızda santrifüjleyin. Süpernatanın tamamını atın. Lökosit pelletini saklayın.  
Not: Santrifüjleme sonrasında lökositler pellet oluşturur. Yüzeide kalan maddenin tamamını attığınızdan emin olun. Var olabilecek kırmızı kan hücresi kalıntılarının sonraki adımlarda yok edildiğinden emin olun.  
Yüzeide kalan maddenin tam olarak atılmaması, lizis işlemine engel teşkil edecek ve lizati seyreltecektir; bu da RNeasy membranına RNA bağlanma koşullarını etkileyecektir. İkisi de RNA verimini etkiler.
4. Lökosit pelletine 20 ml Buffer EL ekleyin ve yukarı-aşağı pipetleyerek yeniden süspansiyon haline getirin.

5. 4°C sıcaklıkta 10 dakika boyunca 400 × g hızda santrifüjleyin. Süpernatanın tamamını atın. Lökosit pelletini saklayın.  
Not: Aşağıdaki santrifüjleme adımları (örn. RNA izolasyonu), 20–25°C sıcaklıkta gerçekleştirilmelidir.
6. β-ME ile tamamlanmış 4 ml Buffer RLT içinde hafifçe vurarak lökosit pelletini gevşetin. Karıştırmak için vorteks yapın veya pipetleyin.  
Not: Kullanım öncesinde Buffer RLT'ye βME eklendiğinden emin olun.
7. Geleneksel bir rotor–stator homojenleştiriciyi en az 45 saniye boyunca son hızda kullanarak, örnek eşit oranda homojen hale gelinceye kadar parçalanma gerçekleşmesini sağlayın. Alternatif olarak, örneğe 10 saniye vorteks yapın ve lizatı 18-20 ölçüm iğnesi takılı bir RNaz içermeyen şırıngadan en az 10 defa geçirin.  
Not: Tamamen parçalanma sağlanmazsa, RNeasy kolonunun tıkanması nedeniyle verim önemli ölçüde düşebilir. Rotor–stator homojenleştiricilerle parçalama işlemi genellikle, diğer homojenleştirme yöntemlerine göre daha yüksek RNA verimi sağlar.  
Not: Örnekler, parçalanma sonrasında –90°C ila –65°C sıcaklıkta lizis tamponu içinde saklanabilir. Dondurulmuş örnekler aylarca stabil kalabilir.

## Total RNA izolasyonu

Bu protokol, 4 ml RLT/β-ME içinde yeniden süspansiyon haline getirilen homojenleştirilmiş lökosit lizatından total hücresel RNA izole etmek üzere tasarlanmıştır.

### Başlamadan önce önemli notlar

- RNeasy silika membran teknolojisi DNA'nın çoğunu etkin bir şekilde yok ettiği için DNase sindirimi gerekli değildir.
- Buffer RLT ve Buffer RW1, içinde guanidin tuzu bulunduğu için ağartıcı içeren dezenfeksiyon maddeleriyle birlikte kullanılamaz. Guanidin tahriş edici bir maddedir. Kullanırken uygun güvenlik önlemlerini alın ve eldiven takın.

- RNeasy protokolü oda sıcaklığında gerçekleştirilmelidir. Prosedür esnasında hızlı çalışın.
- Tüm santrifüjleme adımları 20 ila -25°C sıcaklıkta yapılır. Santrifüjün 20°C altına düşmemesini sağlayın.
- Her santrifüjleme adımında, tüm hacim kolondan geçmelidir. Santrifüjlemeyi tekrarlamak gerekebilir.

## Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Gerekirse, RNA izolasyon protokolüne başlamadan önce, lökosit lizati oda sıcaklığında çözdürün.
- Örnek başına 4 ml %70 etanol hazırlayın.
- RPE Tamponu konsantre olarak gelir. İlk kullanımdan önce, çalışmaya uygun bir çözelti elde etmek için, şişenin üzerinde belirtildiği şekilde 4 hacim etanol (%96–100) ekleyin.

## Prosedür

1. Lizata 4 ml %70 etanol ekleyin ve kuvvetlice çalkalayarak iyice karıştırın. Santrifüj yapmayın.

Not: Etanol eklendikten sonra gözle görülür çökelti oluşabilir. Kuvvetlice çalkalayarak çöktilleri çözün ve hemen 2. adıma geçin. Çöktillerin yeterli derecede çözülmemesi, DNA kontaminasyonuna ve sonuç olarak saf olmayan total RNA örneği elde edilmesine yol açabilir.

2. Oluşmuş olabilecek çökelti ile birlikte örneği, 15 ml santrifüj tüpü (verilir) içine yerleştirilen bir RNeasy Midi Kolonuna koyun. Tüpü yavaşça kapatın ve 4.000 × g hızda 5 dakika santrifüjleyin. Kalıntıları atın.

Not: Maksimum yükleme hacmi 4 ml'dir. Hacim 4,0 ml'nin üzerine çıkarsa, alikotları arka arkaya RNeasy kolonuna yükleyin ve yukarıda açıklandığı şekilde santrifüjleyin. Her bir santrifüjleme adımından sonra kalıntıları atın.

3. adımda santrifüj tüpünü yeniden kullanın.
3. RNeasy Kolonuna 4 ml Tampon RW1 ekleyin. Santrifüj tüpünü yavaşça kapatın ve 4.000 × g hızda 5 dakika santrifüjleyerek kolonu yıkayın. Kalıntıları atın.  
Not: Kalıntılar Tampon RLT veya Tampon RW1 içerir, bu nedenle ağartıcı ile birlikte kullanılamaz.
4. adımda santrifüj tüpünü yeniden kullanın.
4. RNeasy Kolonuna 2,5 ml Buffer RPE ekleyin. Santrifüj tüpünü yavaşça kapatın ve 4.000 × g hızda 2 dakika santrifüjleyerek kolonu yıkayın.  
Not: Buffer RPE konsantre olarak temin edilir. Kullanım öncesinde Buffer RPE'ye etanol eklendiğinden emin olun.
5. adımda santrifüj tüpünü yeniden kullanın. Kalıntının atılması gerekmez.
5. RNeasy Kolonuna 2,5 ml daha Tampon RPE ekleyin. Santrifüj tüpünü yavaşça kapatın ve 4.000 × g hızda 5 dakika santrifüjleyerek RNeasy silika jel membranı kurutun.  
Not: Etanol kalıntısı aşağı yöndeki reaksiyonları etkileyebileceği için RNeasy membranı kurutmak önemlidir. Bu santrifüjleme, elüsyon esnasında hiç etanol taşınmamasını sağlar.  
Not: Santrifüjleme işleminin ardından, kolonun kalıntılarla temas etmemesine özen göstererek RNeasy kolonunu santrifüj tüpünden çıkarın, çünkü temas gerçekleşirse etanol taşınması görülecektir.
6. Ayrıştırmak için, RNeasy Kolonunu yeni bir 15 ml toplama tüpüne (verilir) alın.  
Doğrudan RNeasy silika jel membran üzerine 200 µl RNaz içermeyen su pipetleyin.  
Tüpü yavaşça kapatın. 1 dakika bekletin ve ardından 3 dakika boyunca 4.000 × g hızda santrifüjleyin.
7. 6. adımdan kalan elüatı kullanarak elüsyon adımını (6. adım) tekrarlayın ve ardından 5 dakika boyunca 4.000 × g hızda santrifüjleyin.  
Not: RNA, -90°C ila -65°C sıcaklıkta uzun süreli olarak saklanabilir.



## RNA'da kalite ve miktar tayini

Test kalitesi, giren RNA kalitesine büyük ölçüde bağlıdır. Analiz öncesinde, agaroz jeli elektroforezi veya spektrofotometresi ile saflaştırılmış RNA analiz etmenizi öneririz.

- Spektrofotometreyi kalibre etmek için boş veya nükleaz içermeyen PCR sınıfı su kullanılmalıdır.
- 260 nm'deki 1,0 OD değeri yaklaşık olarak 40 µg/ml tek iplikli RNA'ya eşdeğerdir.
- 1,8-2,1 arasındaki  $OD_{260}/OD_{280}$  oranı yüksek seviyede saflaştırılmış RNA göstergesidir.

RT adımını gerçekleştirmek için gerekli RNA konsantrasyonu 200 ng/µl'dir. Ayrıştırımda kullanılan RNA konsantrasyonu 200 ng/µl'den az olursa RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, kat. no. 74204) kullanılarak elüattaki RNA konsantrasyonunun artırılması gerekir.

Elüattaki RNA konsantrasyonu aralığın üst sınırının üzerindeyse RNaz içermeyen su kullanılarak konsantrasyon 200 ng/µl değerine getirilmelidir.

Not: Normalizasyon sonrasında RNA konsantrasyonunu kontrol edin.

## RNA konsantrasyonu

Bu protokol, RNA'nın konsantre edilmesi için optimize edilmiştir.

### Başlamadan önce önemli notlar

- RNeasy MinElute silika membran teknolojisi DNA'nın çoğunu etkin bir şekilde yok ettiği için DNase sindirimi gerekli değildir.
- Buffer RLT, içinde guanidin tuzu bulunduğu için, ağartıcı içeren dezenfeksiyon maddeleriyle birlikte kullanılamaz.

- Bu prosedürün tüm adımlarını oda sıcaklığında (15-25°C) gerçekleştirin. Prosedür esnasında hızlı çalışın.
- Tüm santrifüjleme adımlarını, standart mikrosantrifüjde 20–25°C sıcaklıkta gerçekleştirin. Santrifüjün 20°C altına düşmemesini sağlayın.
- Buffer RLT saklama esnasında çökeltili oluşturabilir. Gerekirse ısıtarak çözün ve ardından oda sıcaklığında (15-25°C) tutun.

### **Başlamadan önce yapılması gerekenler**

- Konsantrasyon için RNA örneği başına 500 µl %80 etanol hazırlayın.
- Buffer RPE konsantre olarak temin edilir. İlk kullanımdan önce, çalışmaya uygun bir çözelti sağlamak için, şişenin üzerinde belirtildiği şekilde 4 hacim etanol (%96-100) ekleyin.
- Başlamadan önce, kolonları oda sıcaklığında kurun.
- Nihai örnek hacminin 200 µl olması için, işlenecek örneklerin hacmini ölçün ve uygun şekilde ayarlayın.

### **Prosedür**

1. Örnek hacmini RNaz içermeyen su ile birlikte 200 µl olarak şekilde ayarladıktan sonra 700 µl Buffer RLT ekleyin ve iyice karıştırın.
2. Seyreltilmiş RNA'ya 500 µl %96-100 etanol ekleyin ve pipetleyerek iyice karıştırın. Santrifüj yapmayın. Derhal 3. adıma geçin.
3. 2 ml toplama tüpüne (verilir) yerleştirilmiş RNeasy MinElute Dönel Kolona maksimum 700 µl örnek aktarın. Kapağı yavaşça kapatın ve 8.000 × g hızda (≥ 10.000 rpm) 15 saniye santrifüjleyin. Kalıntıları atın. Kalan örnek olursa (700 µl'ye kadar) aktarın ve santrifüjlemeyi tekrarlayın. Kalıntıları atın.

Not: Kalıntılar Tampon RLT içerir, bu nedenle ağartıcı ile birlikte kullanılamaz. Güvenlik bilgisi için bakınız "Uyarılar ve Önlemler" sayfa 15.

4. RNeasy MinElute Dönel Kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne (verilir) koyun.
5. Dönel kolona 500 µl daha Buffer RPE ekleyin. Kapağı yavaşça kapatın ve 8.000 × g hızda (≥ 10.000 rpm) 15 saniye santrifüjleyerek kolon membranını yıkayın. Kalıntıları atın.

Not: Buffer RPE konsantre olarak temin edilir. Kullanım öncesinde Buffer RPE'ye etanol eklendiğinden emin olun.

6. adımda toplama tüpünü yeniden kullanın.

6. RNeasy MinElute Dönel Kolona 500 µl %80 etanol ekleyin. Kapağı yavaşça kapatın ve 8.000 × g hızda (≥ 10.000 rpm) 2 dakika santrifüjleyerek kolon membranını yıkayın. Kalıntıları ve toplama tüpünü atın.

Not: Kalıntılar Tampon RLT içerir, bu nedenle ağartıcı ile birlikte kullanılamaz.

Not: Santrifüjleme işleminin ardından, kolonun kalıntılarla temas etmemesine özen göstererek RNeasy MinElute dönel kolonu toplama tüpünden çıkarın. Aksi takdirde etanol taşınması gerçekleşir.

7. RNeasy MinElute Dönel Kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne (verilir) koyun.
8. Dönel kolonun kapağını açın ve 5 dakika boyunca tam hızda santrifüjleyin. Kalıntıları ve toplama tüpünü atın.

Dönel kolonların kapaklarının zarar görmemesi için, dönel kolonları aralarında en az bir kolonluk yer boş kalacak şekilde santrifüje yerleştirin. Kapakları rotorun dönüş yönünün tersine bakacak şekilde yerleştirin (örn. rotor saat yönünde dönüyorsa kapakları saat yönünün tersine bakacak şekilde yerleştirin).

Etanol kalıntısı aşağı yöndeki reaksiyonları etkileyebileceği için dönel kolon membranını kurutmak önemlidir. Dönel kolonları kapakları açık olarak santrifüjlemek, RNA elüsyonu esnasında etanol taşınması gerçekleşmemesini sağlar.

9. RNeasy MinElute Dönel Kolonu yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne (verilir) koyun.
10. Dönel kolon membranının doğrudan merkezine 20 µl RNaz içermeyen su ekleyin. Kapağı yavaşça kapatın ve RNA elüsyonu sağlamak için 1 dakika boyunca son hızda santrifüjleyin.

11. Elüsyon adımı tamamlandığında örnekleri buz üzerine koyun.

12. Nihai konsantrasyonun 200 ng/µl olması için, işlenecek örneklerin hacmini ölçün ve uygun şekilde ayarlayın.

Ayrıntılı bilgi için bkz. "RNA'da kalite ve miktar tayini", sayfa 25.

## Ters Transkripsiyon

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Kullanılmadığında dondurucuda saklanması gereken ters transkriptaz hariç tüm gerekli bileşenleri çözdüren. Bileşenleri içeren tüpleri buz üzerinde erimeye bırakın.

Not: Çözdürme adımı 30 dakikadan uzun sürmemelidir; aksi takdirde malzeme bozulabilir.

- Ters transkripsiyon (reverse transcription, RT) karışımı hazırlanacak tezgahın üzerini, herhangi bir şablon veya nükleaz kontaminasyonuna karşı temizleyin.
- Ters transkripsiyon reaktiflerini, RNA örneklerini, pozitif kontrolleri, IS-MMR Calibrator içeren tüpleri 10 defa yukarı-aşağı pipetleyerek iyice karıştırın ve kullanım öncesinde kısaca santrifüjleyin. Ardından buzda tutun.
- RT negatif kontrol, nükleaz içermeyen PCR sınıfı su kullanılarak ters transkripsiyon adımı esnasında elde edilir.
- Gerekli girdi, örnek başına 3 µg RNA'dır.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit içinde, sekiz örnekle üç çalışma gerçekleştirmeye yetecek reaktif mevcuttur.

### Prosedür

1. Her örneğin 15 µl'sini, pozitif kontrolleri (yüksek ve düşük pozitif kontroller), suyu (RT negatif kontrol elde etmede kullanılır) ve IS-MMR calibrator'ı 65°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edin. Ardından hemen buza koyun ve 5 dakika soğutun.

2. Tüpün altındaki sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüjleyin (yaklaşık 5 saniye). Ardından buzda tutun.
3. İşlenecek örnek, kontrol ve kalibratör sayısına göre aşağıdaki RT karışımını hazırlayın (Tablo 1).

Not: Reaksiyon başına nihai hacim 25 µl olmalıdır.

**Tablo 1. RT Karışımının hazırlanması**

Bileşen	Örnek başına hacim (µl)	RT karışımı: 12 + +1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
RT Karışımı, 3,33x	7,5	97,5	1x
Ters transkriptaz, 10x	2,5	32,5	1x
Nihai RT karışımı hacmi (4. adımda eklenmek üzere)	10	130	–
Örnek, pozitif kontroller, IS-MMR Calibrator veya su (1. adımdan)	15	Her biri 15	–
Toplam hacim	25	Her biri 25	–

4. RNA örneğini, pozitif kontrolleri, su veya kalibratörü (3. adımdan) içeren etiketli tüplerin her birine 10 µl RT karışım pipetleyin.
5. 10 defa yukarı-aşağı pipetleyerek iyice karıştırın ve kısaca santrifüjleyerek (yaklaşık 5 saniye) tüpün altındaki sıvıyı toplayın.

Not: *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit içindeki tüm ters transkripsiyon reaktiflerini, malzeme bozulmasını önlemek için reaksiyonları kurduktan sonra dondurucuya geri koyun.

6. Tüpleri ısı döngüleyiciye koyun ve ters transkripsiyon programını ayarlayın (Tablo 2).

**Tablo 2. Ters transkripsiyon için sıcaklık profili**

<b>Adım</b>	<b>Parametreler</b>
Reverse transcription 1 (Ters transkripsiyon 1)	Temperature (Sıcaklık): 25°C Time (Süre): 10 dakika
Reverse transcription 2 (Ters transkripsiyon 2)	Temperature (Sıcaklık): 46°C Time (Süre): 45 dakika
Inactivation (İnaktivasyon)	Temperature (Sıcaklık): 85°C Time (Süre): 5 dakika
Cooling (Soğutma)	Temperature (Sıcaklık): 4°C Time (Süre): 5 dakika

7. Program bittikten sonra tüpleri kısaca santrifüjleyerek (yaklaşık 5 saniye) tüpün altındaki sıvıyı toplayın. qPCR deneyini yapıncaya kadar tüpleri buz üzerinde veya – 20°C sıcaklıkta bekletin.

## Manuel analiz: RGQ yazılımı ile 72 tüplük rotora sahip Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında qPCR

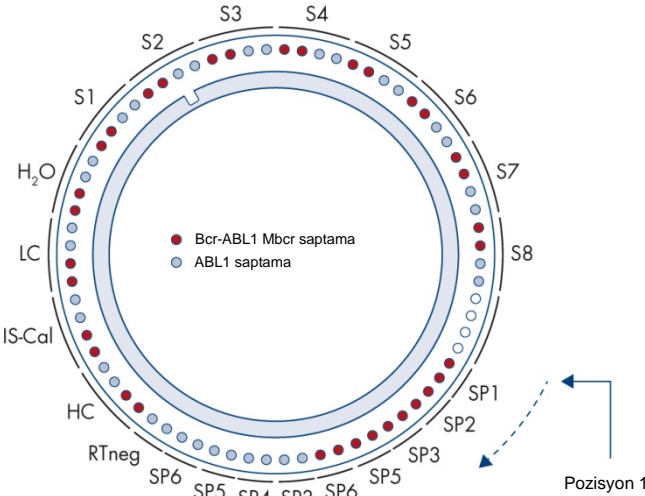
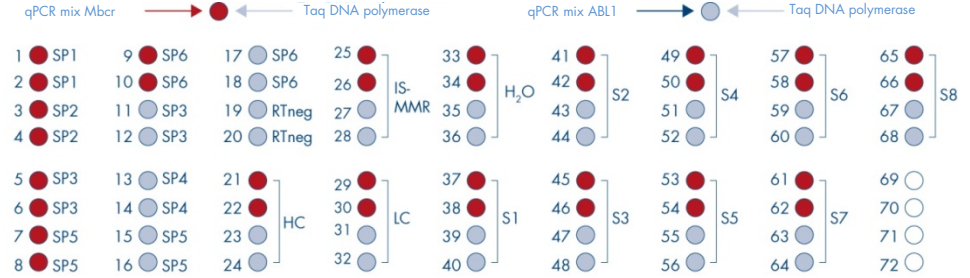
Tüm ölçümleri Tablo 3 içinde gösterildiği gibi çift tekrarlı gerçekleştirmenizi öneririz. Bu kit, aynı deneyde sekiz cDNA örneğini kopyalarıyla birlikte test etmenizi sağlar. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit ile üç deney yapılabilir.

**Tablo 3. 72 tüplük rotora sahip Rotor-Gene Q cihazında reaksiyon sayısı**

Örnek	Reaksiyonlar
qPCR Mix ABL1 ile (34 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA Yüksek Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA Düşük Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaksiyon
Tekli plazmid standartlar	4 x 2 reaksiyon (SP3, SP4, SP5 ve SP6)
RT negatif kontrol	2 reaksiyon
Su kontrolü	2 reaksiyon
qPCR Mix Mbcr ile (34 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA Yüksek Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA Düşük Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaksiyon
Tekli plazmid standartlar	5 x 2 reaksiyon (SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6)
Su kontrolü	2 reaksiyon

## Yükleme bloğu ve rotorun kurulumu

Standartların, primerlerin ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek için aynı deney içinde en az sekiz cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 3 üzerindeki rotor şeması örnek bir deney göstermektedir.



**Şekil 3. Her deney için rotor kurulumu.** SP1–SP6: BCR-ABL1 Mbcr ve ABL1 standartları; RTneg: RT negatif kontrol; IS-Cal: IS-MMR Calibrator; HC: Yüksek Pozitif Kontrol; LC: Düşük Pozitif Kontrol; H<sub>2</sub>O: su kontrolü; S1–S8: cDNA örnekleri.



Not: Tüm boş konumları boş tüplerle doldurun. Sayılar, yükleme bloğu içinde konumları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

## qPCR kurulumu

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Kullanılmadığında dondurucuda saklanması gereken *Taq* DNA polymerase hariç tüm gerekli bileşenleri çözünüz. Bileşenleri içeren tüpleri buz üzerinde erimeye bırakın.  
Not: Çözümleme adımı 30 dakikadan uzun sürmemelidir; aksi takdirde malzeme bozulabilir.
- PCR karışımı hazırlanacak tezgahın üzerini, herhangi bir şablon veya nükleaz kontaminasyonuna karşı temizleyin
- qPCR Mix ABL1 ve qPCR Mix Mbcrl içeren tüpleri 10 defa yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırın ve kullanım öncesinde kısaca santrifüjleyin. Ardından buzda tutun.

### Prosedür

1. İşlenecek örnek sayısına göre PCR ana karışımını hazırlayın.

Tablo 4, 25 µl nihai reaksiyon hacmi elde etmek üzere hesaplanmış bir reaksiyon karışımının hazırlanması için pipetleme şemasını açıklamaktadır. Aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak reaksiyon sayısına göre bir ön karışım hazırlanır (qPCR Mix ABL1 veya qPCR Mix Mbcrl). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Not: 25 µl'den daha az reaksiyon hacmi (reaksiyon karışımı ve örnek) ile işlem yapmayın.

**Tablo 4. PCR ana karışımının hazırlanması**

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	Ön karışım ABL1 veya Mbcr: 34 + 2 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
qPCR Mix (qPCR Mix ABL1 veya qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Taq DNA polymerase	0,25	9	1x
Örnek, standart, kontrol veya IS-MMR Calibrator (3. adımda eklenmek üzere)	5	Her biri 5	–
Toplam hacim	25	Her biri 25	–

- Her 0,1 ml'lik Rotor-Gene Q tüpüne 20 µl qPCR ön karışımı koyun.
- Şekil 4 üzerinde gösterilen örnek düzene göre, ters transkripsiyon sonrasında elde edilen RT ürününden (cDNA) (bkz. "Ters Transkripsiyon", sayfa 28) 5 µl, standartlardan 5 µl, kontrollerden veya IS-MMR Calibrator'dan 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).
- Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.

### **Rotor-Gene MDx'i hazırlama ve qPCR çalışmasını başlatma**

- Tüpleri, cihazla birlikte verilen adaptöre koyun.

Not: Kullanılmayan konumlar boş tüplerle doldurulmalıdır.

- Kilitleme halkasını tüplerin üzerine yerleştirin ve kilitlemek için bastırın.
- Dolu adaptörü Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına yükleyin.
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının ısıl döngüleme programını Tablo 5 içinde gösterildiği şekilde ayarlayın.

Not: Materyallerin bozulmasını önlemek için, tüm *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit bileşenlerini dondurucuya geri koyun.

**Tablo 5. qPCR için sıcaklık profili**

<b>Adım</b>	<b>Parametreler</b>
Mode of analysis (Analiz modu)	Quantitation (Kantitasyon)
Hold 1 (Tutma 1)	Temperature (Sıcaklık): 95°C Time (Süre): 15 dakika
Cycling (Döngü)	50 döngü 94°C; 15 saniye 60°C; Yeşil kanalda FAM floresans alımı ile 60 saniye.

5. "Auto-Gain Optimisation Setup" (Otomatik Optimizasyon Sağlama Kurulumu) iletişim kutusunu açmak için "New Run Wizard" (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusundaki "Gain Optimisation" (Optimizasyon Sağlama) düğmesini tıklatın. Yeşil kanalın "Min Reading" (Minimum Değer) aralığının "5 FI" ve "Max Reading" (Maksimum Değer) aralığının "10 FI" olduğunu, kabul edilebilir Tarama aralığının -10 ve 10 olarak belirlendiğini kontrol edin.
6. "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Optimizasyonu İlk Taramadan Önce Gerçekleştir) seçeneğinin işaretli olduğundan emin olun ve "Auto-Gain Optimisation Setup" (Otomatik Optimizasyon Sağlama Kurulumu) iletişim kutusunu kapatın.
7. Isıl döngüleme programını başlatın.
8. "Edit samples" (Örnekleri düzenle) penceresine giriş yaparak hem ABL1 hem MbcR için alt küme oluşturun.
9. Isıl döngüleme tamamlandığında, "Options" (Seçenekler) ve "Crop Start Cycles" (Ürün Başlangıç Döngüleri) öğelerini seçin. 10. döngüden önceki verileri silin. Ardından, "Analysis" (Analiz) öğesini ve raporda "left threshold = 10.00" (sol eşik = 10,00) olarak belirtilen "Cycling A. Green from 10" (Döngü A. 10'dan itibaren Yeşil) öğesini seçin.

10. Hem ABL1 hem Mbcr için aşağıdaki şekilde ilerleyin:

- "Calculate Automatic Threshold" (Eşiği Otomatik Hesapla) penceresi açılırsa "Cancel" (İptal) ögesini seçin.
- Eşiği 0,03 olarak tanımlayın (pencerenin sağ alt köşesinde).
- Raporda normalizasyon yöntemi olarak "Dynamic Tube" (Dinamik Tüp) ögesini seçin ve gürültü eğimini düzeltmek için "Slope Correct" (Eğim Düzeltme) ögesini seçin.
- "Outlier Removal" (Aykırı Değer Çıkarma) ögesinin %0 olarak ayarlandığından (NTC eşiğine karşılık gelir) ve "Reaction Efficiency Threshold" (Reaksiyon Verimlilik Eşiği) ögesinin devre dışı bırakıldığından emin olun.
- Grafiği doğrusal ölçeğe ayarlayın ve "Auto-Scale" (Otomatik Ölçekleme) yapın.
- Amplifikasyon eğrilerini gösteren pencereye sağ tıklayın ve "Digital filter" (Dijital filtre) ögesinin "Light" (Açık) olarak ayarlandığını kontrol edin.
- Ekranın sağ tarafındaki "named on" (adlandırma tarihi) ögesini seçerek tüm örneklerin görüntülediğinden emin olun.

Tüm adımlar tamamlandıktan sonra ham verilerin kaydedildiğinden emin olun ve sonuç analizine ilerleyin (bkz. "Veri analiz prensibi", sayfa 48).

## Otomatik analiz: RGAM yazılımı ile 72 tüplük rotora sahip Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında qPCR

Tüm ölçümleri Tablo 6 içinde gösterildiği gibi çift tekrarlı gerçekleştirmenizi öneririz. Bu kit, aynı deneyde sekiz cDNA örneğini kopyalarıyla birlikte test etmenizi sağlar. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit ile üç deney yapılabilir.

**Tablo 6. 72 tüplük rotora sahip Rotor-Gene Q cihazında reaksiyon sayısı**

Örnek	Reaksiyonlar
qPCR Mix ABL1 ile (34 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA Yüksek Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA Düşük Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaksiyon
Tekli plazmid standartlar	4 x 2 reaksiyon (SP3, SP4, SP5 ve SP6)
RT negatif kontrol	2 reaksiyon
Su kontrolü	2 reaksiyon
qPCR Mix Mbcr ile (34 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA Yüksek Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA Düşük Pozitif Kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reaksiyon
Tekli plazmid standartlar	5 x 2 reaksiyon (SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6)
Su kontrolü	2 reaksiyon

### Başlamadan önce önemli notlar

*ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı üzerinde Rotor-Gene AssayManager v2.1 ile çalıştırılmalıdır. Protokole başlamadan önce Rotor-

Gene Q MDx cihazı hakkında bilgi edinin. Ayrıntılar için cihazın, Rotor-Gene AssayManager yazılım sürümü 2.1'in ve Gamma Plug-in'in kullanım kılavuzlarına bakın.

Rotor-Gene AssayManager v2.1, PCR sonuçlarının otomatik olarak yorumlanmasını mümkün kılar. Çalışma için döngü parametreleri kilitlidir.

## Başlamadan önce yapılması gerekenler

Rotor-Gene AssayManager yazılım sürümü 2.1, Rotor-Gene Q cihazına bağlı bilgisayara kurulu olmalıdır ve QIAGEN web sitesinden indirilebilir:

[http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2.1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx).

Rotor-Gene AssayManager v2.1 temel yazılım hakkında ayrıntılar için bkz. Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual).

- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit için spesifik Gamma Plug-in gereklidir. Bu eklenti QIAGEN web sitesi sayfasından indirilebilir:  
<https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=bf8c9a8-245b-4ab4-99ea-1b39e2c243a0&lang=en>. Bu eklenti, halihazırda Rotor-Gene AssayManager sürümü 2.1'in yüklü olduğu bir bilgisayara indirilmelidir.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit, ayrıca bir test profili de gerektirir. Bu test profili (\*.iap dosyası), qPCR testinde döngüleme ve analiz yapmak için gereken tüm parametreleri içerir. QIAGEN web sitesinde bulunan *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'e özel web sayfasından indirilebilir: <https://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-bcr-abl1-mbcR-rgq-rt-pcr-kit-ce/#resources>. Test profili Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımına aktarılmalıdır.

Not: *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit, yalnızca Rotor-Gene AssayManager yazılımı v2.1'de belirli yapılandırma ayarları programlandığında çalıştırılabilir.

Sistem çapında süreç güvenliği için aşağıdaki yapılandırma ayarlarının kapalı mod için ayarlanması Őarttır:

- "Material number required" (Materyal numarası zorunlu)
- "Valid expiry date required" (Son kullanma tarihi geçerli olmalı)
- "Lot number required" (Lot numarası zorunlu)

### **Gamma Plug-in kurulumu ve test profilinin ie aktarımı**

742 Gamma Plug-in ve test profilinin kurulumu ve ie aktarımı, sırasıyla Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual) ve Gamma Plug-in Kullanım Kılavuzu (Gamma Plug-in User Manual) olmak üzere Rotor-Gene AssayManager v2.1 ve Gamma Plug-in el kitaplarında ayrıntılarıyla açıklanmıŐtır.

- Hem Gamma Plug-in hem de ipsogen\_BCR-ABL1Mbcr(ABL)\_blood\_CE test profilinin en güncel sürümünü QIAGEN web sitesinden indirin.
- Kurulum işlemine RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_0.msi dosyasına çift tıklayarak baŐlayın ve kurulum talimatlarını izleyin. Bu işlem ile ilgili ayrıntılar için lütfen Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual) belgesinde "Eklentilerin Kurulumu" bölümüne bakın.

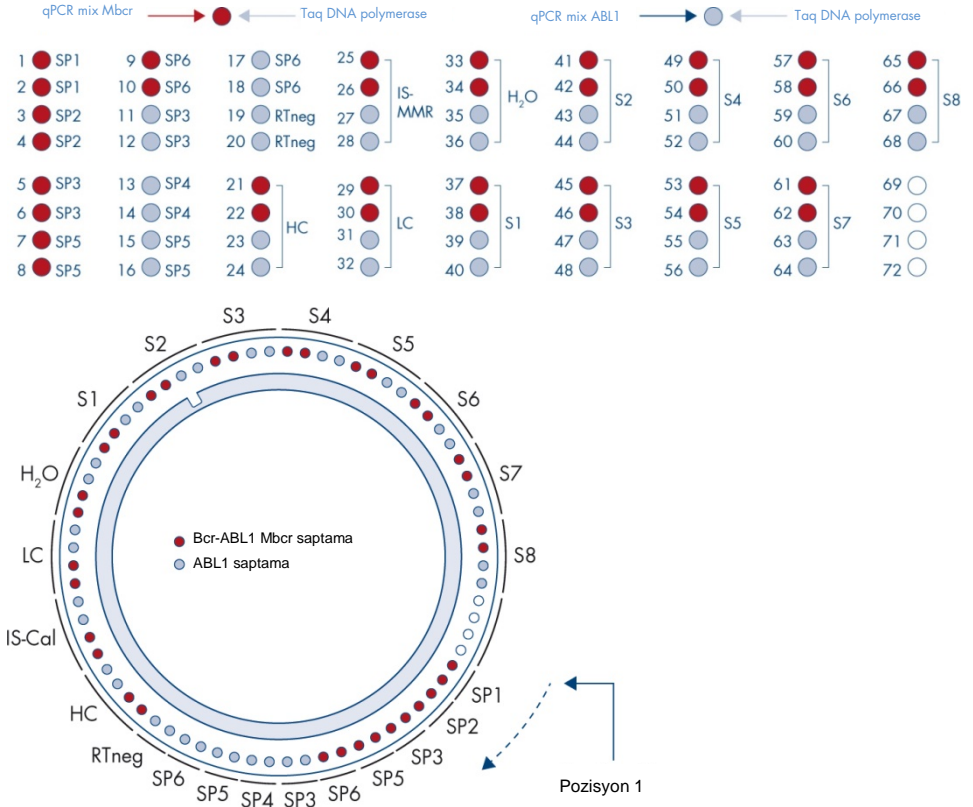
Not: Sistem çapında işlem güvenliği amacıyla, kapalı mod için "Settings" (Ayarlar) sekmesini seçip "Material number required" (Materyal numarası zorunlu), "Valid expiry date required" (Son kullanma tarihi geçerli olmalı) ve "Lot number required" (Lot numarası zorunlu) kutucuklarını işaretleyin (alıŐma listesi bölümü). Bunlar aktif hale getirilmemiŐ (iŐaretlenmemiŐ) ise tıklayarak aktif hale getirin.

- 
- Eklenti başarılı şekilde kurulduktan sonra Rotor-Gene AssayManager yazılımı için yönetici izinlerine sahip bir kişinin ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE test profilini aşağıdaki şekilde içe aktarması gerekir:
1. Yönetici izinlerine sahip bir kullanıcı olarak Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımında oturum açın.
  2. Yapılandırma ortamını seçin.
  3. "Assay Profiles" (Test Profilleri) sekmesini seçin.
  4. "Import" (İçe Aktar) düğmesine tıklayın.
  5. İçe aktarmak üzere iletişim kutusundan ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE test profilini seçin ve "Open" (Aç) öğesine tıklayın.
  6. Test profili başarıyla içe aktarıldıktan sonra "Setup" (Kurulum) ortamında kullanılabilir.
- Not: Bir test profilinin aynı sürümü iki kez içe aktarılamaz.



## Yükleme bloğu ve rotorun kurulumu

Standartların, primerlerin ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek için, aynı deney içinde en az sekiz cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 4 üzerindeki rotor şeması örnek bir deney göstermektedir.



**Şekil 4. Her deney için rotor kurulumu.** SP1–SP6: BCR-ABL1 Mbcr ve ABL1 standartları; RTneg: RT negatif kontrol; IS-Cal: IS-MMR Calibrator; HC: Yüksek Pozitif Kontrol; LC: Düşük Pozitif Kontrol; H<sub>2</sub>O: su kontrolü; S1–S8: cDNA örnekleri. Not: Tüm boş konumları boş tüplerle doldurun. Sayılar, yükleme bloğu içinde konumları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.



Tüpler rotora Şekil 4 üzerinde gösterildiği şekilde yerleştirilmelidir çünkü test profilindeki otomatik analiz seti bu yönde yerleştirmeye göre ayarlanmıştır. Farklı bir düzen kullanılması durumunda anormal sonuçlar alınır.

Not: Tüm boş konumları boş tüplerle doldurun.

## Bir çalışma listesini oluşturma

İşlenecek örnekler için aşağıdaki gibi bir çalışma listesi oluşturun.

1. Rotor-Gene Q MDx cihazını açın.
2. Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımını açın ve kapalı modda operatör rolüne sahip bir kullanıcı olarak oturum açın.
3. Çalışma listesi yöneticisinde "New manual work list" (Yeni manuel çalışma listesi) düğmesine tıklayın ("Setup" (Kurulum) ortamında).
4. "Assay" (Test) adımında mevcut test profilleri listesinden "ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE" test profilini seçin.
5. Seçilen test profilini "Selected assay profiles" (Seçilen test profilleri) listesine aktarmak için "Add assay to work list" (Testi çalışma listesine ekle) düğmesine tıklayın. Test profili artık "Selected assay profiles" (Seçilen test profilleri) listesinde görüntülenmelidir.
6. İlgili alana, örnek sayısını girin.
7. "Kit information" (Kit bilgisi) setini seçin ve kutunun kapağında basılı olan, aşağıdaki *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit bilgilerini girin.
  - Materyal numarası: 0670923
  - Geçerli son kullanma tarihi
  - Lot numarası.
8. "Samples" (Örnekler) adımını seçin. Örnek ayrıntılarını içeren bir liste gösterilir. Bu liste, beklenen rotor düzenini temsil eder.

9. Örnek tanımlama numarasını/numaralarını her örnek için bir yorum gibi tüm isteğe bağlı örnek bilgileriyle birlikte bu listeye girin.
10. "Properties" (Özellikler) adımını seçin ve bir çalışma listesi adı girin.
11. "is applicable" (uygulanabilir) onay kutusunu etkinleştirin.
12. Çalışma listesini kaydedin.
13. Çalışma listesi yazdırılabilir; bu, qPCR hazırlığına ve kurulumuna yardımcı olur. Çalışma listesini yazdırmak için "Print work list" (Çalışma listesini yazdır) düğmesine tıklayın. Örnek bilgileri çalışma listenin bir parçası olacaktır.  
Not: Çalışma listesi dosyaları kaydedilebildiği için, çalışma listesi deney cihazda kurulur kurulmaz veya cihaza örnekler eklenmeden önce oluşturulabilir.

## qPCR kurulumu

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Kullanılmadığında dondurucuda saklanması gereken *Taq* DNA polymerase hariç tüm gerekli bileşenleri çözdüren. Bileşenleri içeren tüpleri buz üzerinde erimeye bırakın.  
Not: Çözdürme adımı 30 dakikadan uzun sürmemelidir; aksi takdirde malzeme bozulabilir.
- PCR karışımı hazırlanacak tezgahın üzerini, herhangi bir şablon veya nükleaz kontaminasyonuna karşı temizleyin
- qPCR Mix ABL1 ve qPCR Mix Mbcr içeren tüpleri 10 defa yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırın ve kullanım öncesinde kısaca santrifüjleyin. Ardından buzda tutun.

## Prosedür

1. İşlenecek örnek sayısına göre PCR ana karışımını hazırlayın.

Tablo 7, 25 µl nihai reaksiyon hacmi elde etmek üzere hesaplanmış bir reaksiyon karışımının hazırlanması için pipetleme şemasını açıklamaktadır. Aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak reaksiyon sayısına göre bir ön karışım hazırlanır (qPCR Mix ABL1 veya qPCR Mix Mbcr). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Not: 25 µl'den daha az reaksiyon hacmi (reaksiyon karışımı ve örnek) ile işlem yapmayın.

**Tablo 7. PCR ana karışımının hazırlanması**

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	Ön karışım ABL1 veya Mbcr: 34 + 2 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
qPCR Mix (qPCR Mix ABL1 veya qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Taq DNA polymerase	0,25	9	1x
Örnek, standart, kontrol veya IS-MMR Calibrator (3. adımda eklenmek üzere)	5	Her biri 5	–
Toplam hacim	25	Her biri 25	–

2. Her 0,1 ml'lik Rotor-Gene Q tüpüne 20 µl qPCR ön karışımı koyun.
3. Şekil 4 üzerinde gösterilen örnek düzene göre, ters transkripsiyon sonrasında elde edilen RT ürününden (cDNA) (bkz. "Ters Transkripsiyon", sayfa 28) 5 µl, standartlardan 5 µl, kontrollerden veya IS-MMR Calibrator'dan 5 µl ekleyin (toplam hacim 25 µl).
4. Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.

## Rotor-Gene MDx'i hazırlama ve qPCR çalışmasını başlatma

1. 72 kuyulu rotoru Rotor-Gene Q MDx rotor tutucuya yerleştirin.
2. Rotoru Şekil 4 üzerinde gösterildiği şekilde atanmış pozisyonlara göre pozisyon 1'den başlayarak ve kullanılmayan tüm pozisyonlara boş kapaklı şerit tüpleri yerleştirerek şerit tüpleriyle doldurun.  
**Not:** İlk tüpün pozisyon 1'e yerleştirildiğinden ve şerit tüplerinin Şekil 4'te gösterildiği şekilde doğru yönelim ve pozisyonda yerleştirildiğinden emin olun.
3. Kilitleme halkasını takın.
4. Rotoru ve kilitleme halkasını Rotor-Gene Q MDx cihazına yükleyin; cihaz kapağını kapatın.
5. Rotor-Gene AssayManager yazılımı v2.1'de çalışma listesi yöneticisinden ilgili çalışma listesini seçin ve "Apply" (Uygula) düğmesine tıklayın veya çalışma listesi hala açıkta sadece "Apply" (Uygula) düğmesine tıklayın.  
**Not:** Deneye özel çalışma listesi oluşturulmadıysa Rotor-Gene AssayManager v2.1'de oturum açın ve aşağıdaki şekilde ilerlemeden önce sayfa 42, "Bir çalışma listesini oluşturma" adımını izleyin.
6. Deney adını girin.
7. Kullanılacak döngüleyiciyi "Cycler selection" (Döngüleyici seçimi) bölümünden seçin.
8. Kilitleme halkasının doğru takılıp takılmadığını kontrol edin ve ekranda bunu onaylayın.
9. "Start run" (Çalışmayı başlat) düğmesine tıklayın. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR çalışması başlar.

## Çıkarın ve qPCR sonuçlarını raporlayın

1. Çalışma bittiğinde "Finish run" (Çalışmayı bitir) ögesine tıklayın.

2. Çalışmayı çıkarın ve onaylayın:

- Approver (Onaylayıcı) rolünde oturum açmış kullanıcılar için: "Release and go to approval" (Serbest bırak ve onaya git) kısmına tıklayın.
- Operator (Operatör) rolünde oturum açmış kullanıcılar için: "Release" (Serbest Bırak) kısmına tıklayın.

3. "Release and go to approval" (Çıkar ve onaya git) ögesine tıklandıysa deney sonuçları görüntülenir.

4. Kullanıcı rolündeki bir kullanıcı tarafından "Release" (Çıkar) ögesine tıklanmışsa "Approver" (Onaylayıcı) rolünde bir kullanıcı oturum açmalı ve "Approval" (Onay) ortamını seçmelidir.

- a. Filtre seçeneklerini seçip "Apply" (Uygula) düğmesine tıklayarak onaylanacak test için filtre uygulayabilirsiniz.
- b. Onaylanacak Deneyin yanında bulunan onay kutusunu işaretleyin.
- c. "Start approval" (Onayı başlat) düğmesine tıklayın.

Deney bir kalibratör içerdiği için kalibratör hakkında zorunlu bilgiler, örneklerin nihai olarak onaylanmasından önce "Calibrator" (Kalibratör) sekmesine girilmelidir.

5. "Use calibrator" (Kalibratörü kullan) düğmesini seçin ve karşılık gelen değeri (IS-MMR Calibrator tüpü üzerinde veya Analiz Sertifikasında bulunur) girin.

Not: Bu değeri "Enter calibrator value" (Kalibratör değeri girin) ve "Reenter calibrator value" (Kalibratör değerini tekrar girin) alanlarına iki kez girmelisiniz.

Girilen değerleri "Apply" (Uygula) düğmesine basarak doğrulayın: sonuçlar güncellenir.

Not: En az bir örnek serbest bırakıldıktan sonra kalibratör artık değiştirilemez.

6. Sonuçları gözden geçirin ve "Release/Report data" (Verileri çıkar/raporla) düğmesine tıklayın.

"OK" (Tamam) kısmına tıklayın. Rapor \*.pdf formatında oluşturulur ve önceden tanımlanmış klasörde otomatik olarak saklanır.

Varsayılan dosya konumu: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Dışa Aktar > Raporlar)

Not: Bu konum ve klasör, "Configuration" (Yapılandırma) ortamından değiştirilebilir.

Not: Sorun giderme için çalışmanın destek paketi gereklidir. Destek paketleri onay veya arşiv ortamında oluşturulabilir (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual), Bölüm 1.8, "Troubleshooting" > "Creating a support package" (Sorun giderme > Destek paketi oluşturma)). Ek olarak, olay tarihine göre  $\pm 1$  gün şeklinde denetim geçmişi girmek faydalı olabilir. Denetim geçmişi "Service" (Hizmet) ortamından alınabilir (bkz. *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual), Bölüm 1.5.5.5).

7. Rotor-Gene Q MDx cihazını boşaltın ve şerit tüplerini yerel güvenlik düzenlemelerine uygun şekilde imha edin.

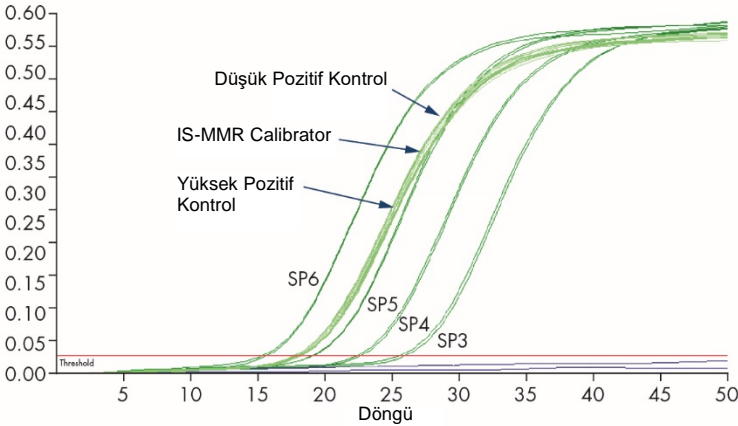
# Sonuçların RGQ Yazılımında Yorumlanması

## Veri analiz prensibi

TaqMan® teknolojisi kullanıldığında, eşğin üzerindeki bir sinyali tespit etmek için gerekli PCR döngüsü sayısına eşik döngü sayısı ( $C_T$ ) adı verilir ve bu sayı, reaksiyonun başlangıcında mevcut olan hedef miktarı ile doğru orantılıdır.

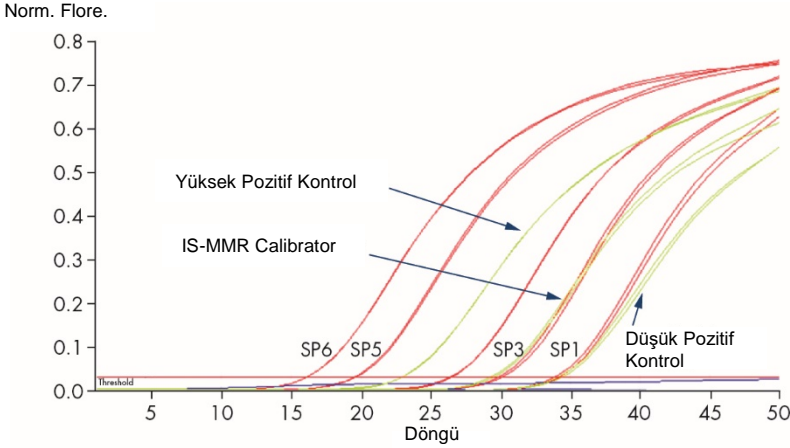
Standartlarla beraber bilinen bir sayıda moleköl kullanarak standart eğriyi bulabilir ve test örneğinde bulunan hedef miktarını tam olarak saptayabilirsiniz. Standart eğrileri plazmid tabanlıdır. Standart eğrilerinin doğruluğundan emin olmak amacıyla ABL1 için dört standart dilüsyon ve MbcR için beş standart dilüsyon kullanılır. Kit içinde ayrıca, sonuçların uluslararası ölçeğe dönüştürülmesini sağlayan bir IS kalibratörü de bulunur. Şekil 5 ve Şekil 6 üzerinde, standartlar için alınanlara benzer TaqMan amplifikasyon eğrileri, IS-MMR Calibrator, High Positive RNA Control ve Low Positive RNA Control ile birlikte *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit gösterilmektedir.

Norm. Flore.



Şekil 5. Kontroller ve SP3, SP4, SP5 ve SP6 standartları ile ABL1 saptama.  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  ve  $10^6$  kopya/reaksiyon.





**Şekil 6. Kontroller ve SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6 standartları ile BCR-ABL1 MbcR saptama.  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  ve  $10^6$  kopya/reaksiyon.**

## Ham veriler için geçerli standart eğrileri ve kalite kriterleri

### Kopyalar arasındaki yeniden üretilebilirlik

Kopyalar arasındaki  $C_T$  değeri değişkenliği  $\leq 2$  olmalıdır veya kopya aşağıdaki durumlar dışında geçersiz sayılmalıdır:

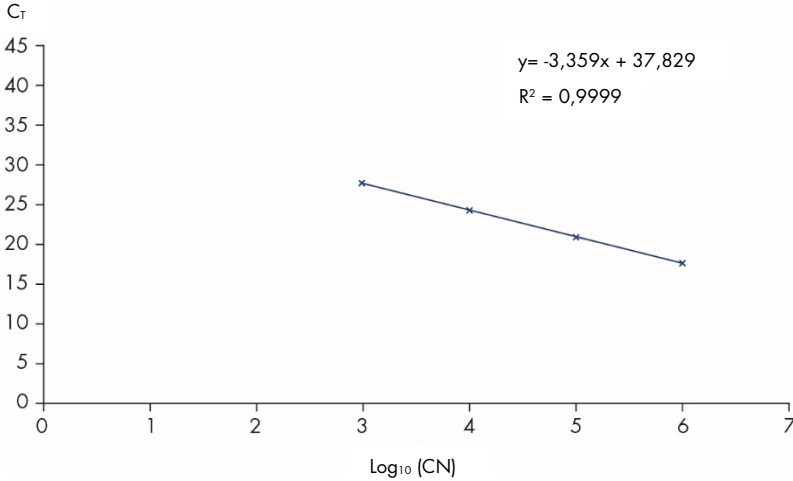
Ortalama  $C_T \geq 36$  veya  $C_{Ta} \geq 36$  ve  $C_{Tb}$  "saptanamıyorsa"  $\Delta C_T$  kriterleri geçersizdir; kopya uygundur. Böyle bir durumda  $C_{Ta}$  için hesaplanan kopya sayısı (CN) 2'ye bölünmelidir.

Not: Kullanıcılar kendi laboratuvarlarında yeniden üretilebilirlik ölçümü yapmalıdır.

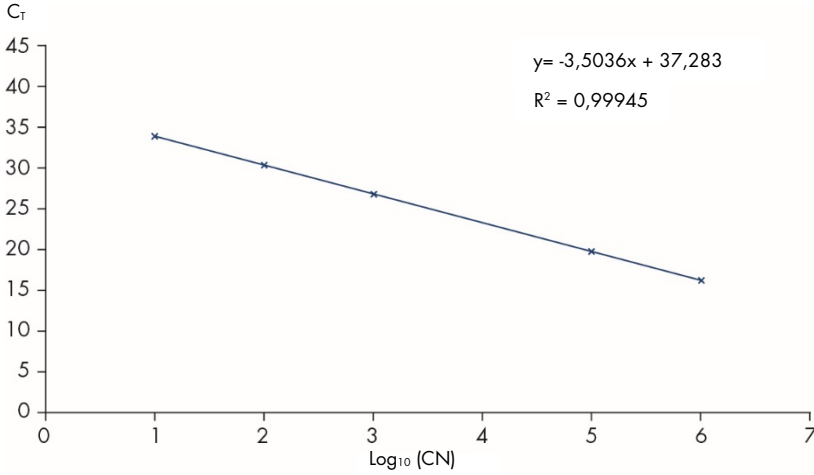
## Standart eğrileri

Ham veriler analiz için bir Excel® dosyasına yapıştırılabilir.

Her bir gen için (ABL1 ve BCR-ABL1 Mbc), plazmid standart dilüsyonlarından alınan  $C_T$  değerlerinin grafiği log kopya sayısına göre çıkarılır (SP3, SP4, SP5 ve SP6 için 3, 4, 5 ve 6; SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6 için 1, 2, 3, 5 ve 6). Şekil 7 üzerinde, dört standart dilüsyon ile hesaplanan ABL1 eğrisinin örneği verilmiştir. Şekil 8 üzerinde, beş standart dilüsyon ile hesaplanan BCR-ABL1 Mbc eğrisinin örneği verilmiştir.



**Şekil 7. Dört standart dilüsyon üzerinden hesaplanan ABL1 standart eğrisi.** Bir doğrusal regresyon eğrisi ( $y = ax + b$ ) hesaplanır. Burada "a" çizginin eğimi ve "b" ise çizginin y eksenini kestiği noktanın y koordinatı olan y kesişime noktasıdır. Eşitlik ve belirleme katsayısı ( $R^2$ ) grafikte gösterilmektedir.



**Şekil 8. Beş standart dilüsyon üzerinden hesaplanan BCR-ABL1 Mbc standart eğrisi.** Bir doğrusal regresyon eğrisi ( $y = ax + b$ ) hesaplanır. Burada "a" çizginin eğimi ve "b" ise çizginin y eksenini kestiği noktanın y koordinatı olan y kesişime noktasıdır. Eşitlik ve belirleme katsayısı ( $R^2$ ) grafikte gösterilmektedir.

Standartlar onlu dilüsyonlar olduğu için, eğrinin teorik eğimi -3,3'tür.  $R^2 > 0,95$  olduğu sürece -3,1 ile -3,6 arasında bir eğim kabul edilebilir. Ancak, hassas sonuçlar almak için istenen değer  $R^2 > 0,98$  şeklindedir.

Not: BCR-ABL Mbc standart eğrisini oluşturabilmek için SP1 standart dilüsyonu (BCR-ABL1 plazmid, 10 kopya) saptanmalıdır.

## Kopya sayısı (CN)

Bilinmeyen örnekler için qPCR Mix ABL1 veya qPCR Mix Mbc ile alınan ham  $C_T$  değerlerini ABL1 veya BCR-ABL1 kopya sayılarına dönüştürmek için ABL1 veya BCR-ABL1 Mbc standart eğrisi eşitliği kullanılmalıdır ( $ABL1_{CN}$  veya  $BCR-ABL1 Mbc_{CN}$ ).

$$\text{Log}_{10} \text{ örnek ABL1}_{\text{CN}} = \frac{\text{Ortalama ABL } C_T - \text{ABL1 standart eğrisi kesişme noktası}}{\text{ABL standart eğrisinin eğimi}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ örnek BCR-ABL1 Mbcrcn} = \frac{\text{Ortalama BCR-ABL1 Mbcrcn } C_T - \text{BCR-ABL1 Mbcrcn standart eğrisinin kesişme noktası}}{\text{BCR-ABL1 Mbcrcn standart eğrisinin eğimi}}$$

## Tüm ABL1<sub>CN</sub> değerlerinde kalite kontrol

Düşük RNA kalitesi veya RT-qPCR esnasında oluşan sorunlar, ABL1 kopya sayısının düşük olmasına yol açabilir.

Optimum test hassasiyeti sağlamak için High Positive RNA Control, Low Positive RNA Control ve IS-MMR Calibrator için ABL1<sub>CN</sub> değerinin 100.000 veya bu değer üzerinde olması gerekir.

## RT negatif ve su kontrolleri

PCR adımı (su kontrolü) ve ters transkripsiyon adımı (RT negatif kontrol) için şablonuz kontrol (NTC), hem ABL1 hem BCR-ABL1 Mbcrcn için sıfır CN sonucunu vermelidir. Sonuç olarak, sırasıyla, hiçbir C<sub>T</sub> değeri alınmamalı veya C<sub>T</sub> değeri standart eğrilerinin kesişme noktasının üstünde olmalıdır. Bu NTC'ler için pozitif sonuç alınması, ters transkripsiyon ve/veya qPCR esnasında çapraz kontaminasyon olduğunu gösterir.

## Normalize kopya sayısı (NCN)

Bu CN değerlerinin oranı, normalize kopya sayısını (normalized copy number, NCN) verir:

$$\text{NCN} = \frac{\text{BCR-ABL1 Mbc}_{\text{CN}}}{\text{ABL1}_{\text{CN}}} \times 100$$

High Positive RNA Control (NCN<sub>HC</sub>), Low Positive RNA Control (NCN<sub>LC</sub>), IS MMR kalibratör (NCN<sub>cal</sub>) ve her bir örnek (NCN<sub>örnek</sub>) için NCN sonucunu hesaplayın.

## Normalize kopya sayısı değerlerinde kalite kontrol

High Positive RNA Control, Low Positive RNA Control ve IS-MMR Calibrator, transkript kalite tayini esnasında ters transkripsiyonun ve ABL1 ve BCR-ABL1 Mbcr amplifikasyon adımlarının izlenmesine olanak tanır.

- IS-MMR Calibrator için alınan ve *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kiti ile test edilen NCN sonucu, 0,05-0,3 aralığında olmalıdır. Aksi takdirde NCN değerleri Uluslararası Ölçek değerine dönüştürülemez.
- Deneyin hassasiyeti yalnızca Low Positive RNA Control saptanırsa değerlendirilebilir.

## Uluslararası ölçek dönüşümü

Not: Yorumlama öncesinde, IS-MMR Calibrator tüpü etiketinde veya kitle birlikte verilen analiz sertifikasında yer alan değere bakın. (Etikette ve sertifikada aynı değer gösterildiğini kontrol edin).

Normalize kopya sayısını uluslararası ölçekte hesaplamak için (IS-NCN<sub>sample</sub>), deneysel IS-MMR Calibrator NCN sonucunu (NCN<sub>cal</sub>) ve analiz sertifikasında belirtilmiş atanan değeri (IS-Cal değeri) kullanın.

$$\text{IS-NCN}_{\text{sample}} = \frac{\text{NCN}_{\text{örnek}} \times \text{IS-Cal değeri}}{\text{NCN}_{\text{cal}}}$$

### IS-NCN değerlerinde kalite kontrol

- IS-NCN<sub>HC</sub> sonucu (High Positive RNA Control için uluslararası ölçekte NCN) majör moleküler yanıt vermemelidir ("MMR yok", aşağıda bkz. "Moleküler yanıtın raporlanması").
- MR4,5 durumunun güvenle belirlenebilmesi için IS-NCN<sub>LC</sub> sonucu (Low Positive RNA Control için uluslararası ölçekte NCN) < 0,01 (MR4) olmalıdır.

## Moleküler yanıtın raporlanması

Tablo 8 üzerindeki yorumlamaya göre her bir örneğin moleküler yanıt durumunu belirleyin.

**Tablo 8. Moleküler yanıtın raporlanması**

Vaka	ABL CN	BCR-ABL1 Mbc CN	%IS-NCN	Durum
1	< 10.000	< 10	–	Düşük kaliteli örnek
2	<10.000	$\geq 10$	$>0,1$	MMR yok
		$\geq 10$	$\leq 0,1$	Belirsiz sonuç
3	$10.000 \leq CN_{ABL} < 32.000$	$\geq LOD$	$>0,1$	MMR yok
			$\leq 0,1$	MMR
		$LOB < CN < LOD$ CN'yi LOD ile değiştirin	$>0,1$	MMR yok
			$\leq 0,1$	MMR
4	$32.000 \leq CN_{ABL} < 100.000$	$\leq LOB$	–	Saptanmadı/MR4
		$\geq LOD$	$>0,1$	MMR yok
			$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
			$\leq 0,01$	MR4
		$LOB < CN < LOD$ CN'yi LOD ile değiştirin	$>0,1$	MMR yok
			$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
5	$100.000 \leq CN_{ABL}$	$\leq LOB$	–	Saptanmadı/MR4,5
		$\geq LOD$	$> 0,1$	MMR yok
			$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
			$0,0032 < IS \leq 0,01$	MR4
			$\leq 0,0032$	MR4.5
		$LOB < CN < LOD$ CN'yi LOD ile değiştirin	$>0,1$	MMR yok
			$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
			$0,0032 < IS \leq 0,01$	MR4
	$\leq 0,0032$	MR4.5		
	$\leq LOB$	–	Saptanmadı/MR5	

LOB: limit of blank (boş örnek sınırı); LOD: limit of detection (tespit sınırı); MR: molecular response (moleküler yanıt); MMR: major molecular response (majör moleküler yanıt).

## Kalite kriterlerinin özeti

Tablo 9, çeşitli kalite kriterlerini ve ilgili değer veya sonuçları özetlemektedir.

Tablo 9. Kalite kriterlerinin özeti

Kriterler	Kabul edilebilir değerler/sonuçlar
Kopyalar arasındaki $C_T$ değeri değişimleri	$\leq 2 C_T$ Ortalama $C_T \geq 36$ veya $C_{Ta} \geq 36$ ve $C_{Tb}$ "saptanamıyor" olduğu durumlar hariç: kopya uygundur. $C_{Ta}$ için hesaplanan CN değeri 2'ye bölünmelidir.
Standart eğrileri için eğim	-3,1 ile -3,6 arası
Standart eğriler için $R^2$	En az > 0,95 (ideal olarak > 0,98)
SP1 standart dilüsyon (BCR-ABL1 10 kopya plazmid)	Standart eğrisini oluşturmak için saptanmalı
Biyoloji örnekleri için $ABL_{CN}$ değerinde kalite kontrol	Bkz. Tablo 8
High Positive RNA Control, Low Positive RNA Control ve IS-MMR Calibrator	$ABL_{CN} \geq 100.000$
NTC (su) ve RTneg kontrolleri	Her bir $ABL_{CN} = 0$ ve $Mbct_{CN} = 0$ için ( $C_T$ değeri yok veya $C_T >$ standart eğrisi kesişme noktası)
IS-MMR Calibrator için alınan NCN ( $NCN_{cal}$ )	0,05–0,3 arasında olmalı
Yüksek Pozitif RNA Kontrolü	Saptanmalı
Düşük Pozitif RNA Kontrolü	Saptanmalı
IS- $NCN_{HC}$	Durum: Majör moleküler yanıt yok
IS- $NCN_{LC}$	$IS-NCN_{LC} \leq 0,01$ (MR4) MR4,5 durumunun güvenle belirlenebilmesi için saptanmalı.

$C_T$ : threshold cycle (eşik döngüsü); HC: high control (yüksek kontrol); IS: International Standard (Uluslararası Standart); LC: low control (düşük kontrol); MR: molecular response (moleküler yanıt); MMR: major molecular response (majör moleküler yanıt); NCN: normalized copy number (normalize kopya sayısı); NTC: No Template Control (Şablonsuz Kontrol); RTneg: reverse transcription negative (ters transkripsiyon negatif).



# Sonuçların RGAM Yazılımında Yorumlanması

Analiz tamamen otomatiktir.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 öncelikle amplifikasyon eğrilerini analiz eder; şekillerine ve gürültü miktarlarına bakarak uygun olmayan eğrileri geçersiz sayabilir. Böyle bir durum söz konusu olursa, geçersiz sayılan eğri, bir işaretle ilişkilendirilir.

Test örneklerinin sonuçları otomatik olarak Rotor-Gene AssayManager v2.1 tarafından analiz edilip ayarlanır ancak onaylayıcı rolüyle oturum açmış kullanıcı tarafından onaylanması ve serbest bırakılması gerekir. Onaylanacak örnekler sonuçlarının belirlenmiş satırın sonunda üç ek onay düğmesi bulunur. Bu düğmeler örnek sonuçlarını etkileşimli olarak kabul veya reddetmek için kullanılır. Daha fazla bilgi için lütfen bkz. *Gamma Plug-in Kullanım Kılavuzu* (Gamma Plug-in User Manual).

Ardından Rotor-Gene AssayManager v2.1 çalıştırma kontrollerini analiz eder:

- NTC (RT-neg ve H<sub>2</sub>O), spesifik amplifikasyon (ABL1 ve BCR-ABL1 Mbcr) yokluğu bakımından kontrol edilir.
- ABL1 ve BCR-ABL1 Mbcr SP: Doğrulama her birinin R<sup>2</sup> ve eğim değerlerini esas alır.
- HC: ABL1 kopya sayısı, bu kontrolün yorumlanmasına yetecek kadar yüksek olmalıdır. Bu durumda IS-NCN yüzdesi hesaplanacaktır. Bu çalışma kontrolü, durumu teste göre No MMR (MMR Yok) olduğunda doğrulanır.
- LC: ABL1 kopya sayısı, bu kontrolün yorumlanmasına yetecek kadar yüksek olmalıdır. Bu durumda IS-NCN yüzdesi hesaplanacaktır. Bu çalışma kontrolü, durumu teste göre MR4 olduğunda doğrulanır.
- IS-MMR Calibrator: ABL1 kopya sayısı, bu kontrolün yorumlanmasına yetecek kadar yüksek olmalıdır. Bu durumda NCN hesaplanacaktır. Bu çalışma kontrolü, NCN'si teste göre kabul edilebilir aralık dahilindeyse doğrulanır.

---

Not: Çalışmanın sonunda oluşturulan rapor, çalışma kontrollerinden alınan sonuçları gösterir ve geçersiz verilerin önünde geçersizlik bayrakları bulunur.

Çalışmadaki tüm kontroller uygun değerdeyse, Rotor-Gene AssayManager v2.1 bilinmeyen örnekleri analiz eder.

Örnekte, replikatlar arasındaki  $C_T$  değerleri arasındaki farklılık, sonuçların yorumlanmasına yetecek ölçüde düşük olmalıdır. Ardından IS-NCN yüzdesi hesaplanacak ve örnek durumu sunulacaktır.

Not: Hem çalışma kontrolleri hem de örnek sonuçları geçerliyse raporda her bir örnek için ABL1 ve BCR-ABL1 Mbcr kopya sayıları, NCN (%), IS-NCN (%) ve moleküler yanıt durumu gösterilir.

Tablo 10 ve Tablo 11, sırasıyla, Rotor-Gene AssayManager v2.1 tarafından yapılan analiz esnasında her bir tüpe verilebilecek geçersiz kılan ve uyarı niteliğindeki örnek işaretlerini ve bu işaretlerin anlamlarını göstermektedir.

**Tablo 10. Geçersiz kılıcı örnek işaretleri ve terimlerin tanımları**

<b>İşaret</b>	<b>Açıklama</b>
ANALYSIS_FAILED (ANALİZ_BAŞARISIZ)	Test geçersiz olarak belirlenmiştir çünkü analiz başarısız olmuştur. QIAGEN Teknik Servisleri ile bağlantı kurun.
ASSAY_INVALID (TEST GEÇERSİZ)	Test geçersizdir çünkü en az bir harici kontrol geçersizdir.
CONSECUTIVE_FAULT (SONRAKİ HATA)	Bu hedefin hesaplanması için kullanılan bir hedef geçersizdir.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (EĞRİ ŞEKLİ ANOMALİSİ)	Ham veri amplifikasyon eğrisi, bu test için tesis edilen davranıştan farklı bir şekil göstermektedir. Yanlış sonuç alınmış veya sonuçların yanlış yorumlanmış olması olasılığı yüksektir.
FLAT_BUMP (DÜZ ÇIKINTI)	Ham veri amplifikasyon eğrisi, bu test için tesis edilen davranıştan düz bir tümsek şeklinde farklılık göstermektedir. Yanlış sonuç olasılığı veya sonuçların yanlış yorumlanma olasılığı yüksektir (örn. yanlış C <sub>T</sub> değeri belirlenmesi).
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (YÜKSEK PK YÜKSEK DELTA CT) (ABL veya MbcR)	Kontrol geni karışımındaki Yüksek Pozitif Kontrol replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (YÜKSEK PK YÜKSEK DELTA CT) (MbcR)	Füzyon geni karışımındaki Yüksek Pozitif Kontrol replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
HIGH_PC_LOW_ABL_CN (YÜKSEK PK DÜŞÜK ABL CN)	Yüksek Pozitif Kontrol için kontrol geni kopya sayısı çok düşüktür.
HIGH_PC_LOW_IS_NCN (YÜKSEK PK DÜŞÜK IS NCN)	Yüksek Pozitif Kontrol için Normalize Kopya Sayısı (Uluslararası Ölçek) çok düşüktür.
HIGH_PC_NO_CT (YÜKSEK PK CT YOK) (ABL)	Kontrol geni karışımında, Yüksek Pozitif Kontrol için saptanabilir C <sub>T</sub> yoktur.
HIGH_PC_NO_CT (YÜKSEK PK CT YOK) (MbcR)	Füzyon geni karışımında, Yüksek Pozitif Kontrol için saptanabilir C <sub>T</sub> yoktur.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (YÜKSEK PK REPLİKATI CT YOK) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki Yüksek Pozitif Kontrol replikatlarından biri saptanmamıştır.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (YÜKSEK PK REPLİKATI CT YOK) (MbcR)	Füzyon geni karışımındaki Yüksek Pozitif Kontrol replikatlarından biri saptanmamıştır.
INVALID_CALCULATION (GEÇERSİZ HESAPLAMA)	Bu hedef için hesaplama başarısızdır.
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (IS KAL YÜKSEK DELTA CT) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki IS-MMR-Calibrator replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.

<b>İşaret</b>	<b>Açıklama</b>
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (IS KAL YÜKSEK DELTA CT) (Mbc)	Füzyon geni karışımındaki IS-MMR-Calibrator replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
IS-CAL_HIGH_NCN (IS KAL YÜKSEK NCN)	IS-MMR-Calibrator için Normalize Kopya Sayısı çok yüksektir.
IS-CAL_LOW_ABL_CN (IS KAL DÜŞÜK ABL CN)	IS-MMR-Calibrator için kontrol geni kopya sayısı çok düşüktür.
IS-CAL_LOW_NCN (IS KAL DÜŞÜK NCN)	IS-MMR-Calibrator için Normalize Kopya Sayısı çok düşüktür.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (IS KAL REPLİKATI CT YOK) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki IS-MMR-Calibrator replikatlarından biri saptanmamıştır.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (IS KAL REPLİKATI CT YOK) (Mbc)	Füzyon geni karışımındaki IS-MMR-Calibrator replikatlarından biri saptanmamıştır.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (DÜŞÜK PK YÜKSEK DELTA CT) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki Düşük Pozitif Kontrol replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (DÜŞÜK PK YÜKSEK DELTA CT) (Mbc)	Füzyon geni karışımındaki Düşük Pozitif Kontrol replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
LOW_PC_HIGH_IS-NCN (DÜŞÜK PK YÜKSEK IS NCN)	Düşük Pozitif Kontrol için Normalize Kopya Sayısı (Uluslararası Ölçek) çok yüksektir.
LOW_PC_LOW_ABL_CN (DÜŞÜK PK DÜŞÜK ABL CN)	Düşük Pozitif Kontrol için kontrol geni kopya sayısı çok düşüktür.
LOW_PC_NO_CT (DÜŞÜK PK CT YOK) (ABL)	Kontrol geni karışımında, Düşük Pozitif Kontrol için saptanabilir C <sub>T</sub> yoktur.
LOW_PC_NO_CT (DÜŞÜK PK CT YOK) (Mbc)	Füzyon geni karışımında, Düşük Pozitif Kontrol için saptanabilir C <sub>T</sub> yoktur.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (DÜŞÜK PK REPLİKATI CT YOK) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki Düşük Pozitif Kontrol replikatlarından biri saptanmamıştır.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (DÜŞÜK PK REPLİKATI CT YOK) (Mbc)	Füzyon geni karışımındaki Düşük Pozitif Kontrol replikatlarından biri saptanmamıştır.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (ÇOKLU EŞİK GEÇİŞİ)	Amplifikasyon eğrisi, eşiği bir defadan fazla geçer. Belirsiz olmayan bir C <sub>T</sub> saptanamamıştır.
NO_BASELINE (REFERANS HATTI YOK)	Başlangıç referans hattı bulunamamıştır. Sonraki analizler gerçekleştirilemez.
NTC_UNEXPECTED_VALUE (NTC BEKLENMEYEN DEĞER)	Şablonsuz kontrolde C <sub>T</sub> saptanmıştır.
OTHER_TARGET_INVALID (DİĞER HEDEF GEÇERSİZ)	Aynı örnek için başka bir hedef geçersizdir.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE (HESAPLAMA ARALIĞI DIŞINDA)	Bu örnek için hesaplanan konsantrasyon teknik sınırı aşmaktadır.

<b>İşaret</b>	<b>Açıklama</b>
RUN_FAILED (ÇALIŞMA BAŞARISIZ)	Döngüleyici veya döngüleyici bağlantısında bir sorun nedeniyle test geçersiz olarak belirlenmiştir.
RUN_STOPPED (ÇALIŞMA DURDURULDU)	Çalışma manuel olarak durdurulduğu için test geçersiz olarak belirlenmiştir.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (ÖRNEK YÜKSEK DELTA CT) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki test örneği replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (ÖRNEK YÜKSEK DELTA CT) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni karışımındaki test örneği replikatlarının C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (ÖRNEK REPLİKATI CT YOK) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki test örneği replikatlarından biri saptanmamıştır.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (ÖRNEK REPLİKATI CT YOK) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni karışımındaki test örneği replikatlarından biri saptanmamıştır.
SATURATION (SATÜRASYON)	Ham veri floresanı, amplifikasyon eğrisinin infleksiyon noktası öncesinde güçlü saturasyon göstermektedir.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (CT'YE YAKIN DİKEN)	Amplifikasyon eğrisinde C <sub>T</sub> değerinin yakınında ani bir artış saptanmıştır.
SP_HIGH_SLOPE (SP YÜKSEK EĞİM) (ABL)	Kontrol geni eğiminin üst sınırı aşılmıştır.
SP_HIGH_SLOPE (SP YÜKSEK EĞİM) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni eğiminin üst sınırı aşılmıştır.
SP_LOW_RSQUARED (SP DÜŞÜK RKARE) (ABL)	Kontrol geni R <sup>2</sup> değerinin alt sınırı karşılanmamıştır.
SP_LOW_RSQUARED (SP DÜŞÜK RKARE) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni R <sup>2</sup> değerinin alt sınırı karşılanmamıştır.
SP_LOW_SLOPE (SP DÜŞÜK EĞİM) (ABL)	Kontrol geni eğiminin alt sınırı karşılanmamıştır.
SP_LOW_SLOPE (SP DÜŞÜK EĞİM) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni eğiminin alt sınırı karşılanmamıştır.
SP1_NO_CT (SP1 CT YOK) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni karışımında, standart plazmid 1 için saptanabilir C <sub>T</sub> yoktur.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (STANDART YÜKSEK DELTA CT) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki standart replikatların C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (STANDART YÜKSEK DELTA CT) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni karışımındaki standart replikatların C <sub>T</sub> değerleri arasındaki farklılık çok yüksektir.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (STANDART REPLİKAT CT YOK) (ABL)	Kontrol geni karışımındaki standart replikatlardan biri saptanmamıştır.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (STANDART REPLİKAT CT YOK) (Mbc <sub>r</sub> )	Füzyon geni karışımındaki standart replikatlardan biri saptanmamıştır.
STEEP_BASELINE (DİK REFERANS HATTI)	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresansı için dik bir şekilde yükselen referans hattı saptanmıştır.

<b>İşaret</b>	<b>Açıklama</b>
STRONG_BASELINE_DIP (KUVVETLİ REFERANS HATTI DÜŞÜŞÜ)	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresansı için kuvvetli bir şekilde düşen referans hattı saptanmıştır.
STRONG_NOISE (GÜÇLÜ PARAZİT)	Amplifikasyon eğrisinin yükselme fazı dışında büyük bir parazit saptanmıştır.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (BÜYÜME FAZINDA GÜÇLÜ PARAZİT)	Amplifikasyon eğrisinin büyüme (eksponansiyel) fazında güçlü parazit saptanmıştır.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (DALGALI REFERANS HATTI FLORESANSI)	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresansı için dalgalı referans hattı saptanmıştır.

**Tablo 11. Uyarıcı örnek işaretleri ve terimlerin tanımları**

<b>İşaret</b>	<b>Açıklama</b>
CN Mbc Between LOB and LOD (CN Mbc, LOB ve LOD Arasında)	Test örneğinin füzyon geni kopya sayısı LOB ile LOD arasında olup LOD değeriyle değiştirilmiştir.
CN Mbc Single Replicate (CN Mbc Tek Replikat)	Test örneğinin füzyon geni kopya sayısı, yalnızca bir replikat üzerinden hesaplanmıştır ve 2'ye bölünmüştür.
CN Mbc Single Replicate Between LOB and LOD (CN Mbc Tek Replikat, LOB ve LOD Arasında)	Test örneğinin füzyon geni kopya sayısı (yalnızca bir replikat üzerinden hesaplanan ve 2'ye bölünen) LOB ile LOD arasında olup LOD değeriyle değiştirilmiştir.
IS-NCN (%) Between LOB and LOD (IS-NCN (%), LOB ve LOD Arasında)	Test örneğinin normalize kopya sayısı (uluslararası ölçek), LOB ve LOD arasında bir füzyon geni kopya sayısı değerine dayalı olarak elde edilmiştir.
IS-NCN (%) Single Replicate (IS-NCN (%) Tek Replikat)	Test örneğinin normalize kopya sayısı (uluslararası ölçek), yalnızca bir replikat üzerinden hesaplanan füzyon geni kopya sayısına dayalı olarak elde edilmiştir.
IS-NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (IS-NCN (%) Tek Replikat, LOB ve LOD Arasında)	Testin normalize kopya sayısı (uluslararası ölçek), LOB ve LOD değerleri arasındaki bir füzyon geni kopya sayısına (tek bir replikat üzerinden hesaplanan) dayalı olarak elde edilmiştir.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (DÜŞÜK FLORESANS DEĞİŞİMİ)	En büyük floresans değişimi olan örnek tüpüne relatif olarak bu örnek için yüzde floresans değişimi tanımlanmış bir sınırdan düşüktür.
LOW_REACTION_EFFICIENCY (DÜŞÜK REAKSİYON ETKİNLİĞİ)	Bu örnek için reaksiyon etkinliği tanımlanmış bir sınıra ulaşmamıştır.
NCN (%) Between LOB and LOD (NCN (%), LOB ve LOD Arasında)	Test örneğinin normalize kopya sayısı, LOB ve LOD arasında bir füzyon geni kopya sayısı değerine dayalı olarak elde edilmiştir.
NCN (%) Single Replicate (NCN (%) Tek Replikat)	Test örneğinin normalize kopya sayısı, yalnızca bir replikat üzerinden hesaplanan füzyon geni kopya sayısına dayalı olarak elde edilmiştir.
NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (NCN (%) Tek Replikat, LOB ve LOD Arasında)	Test örneğinin normalize kopya sayısı, LOB ve LOD değerleri arasındaki bir füzyon geni kopya sayısına (tek bir replikat üzerinden hesaplanan) dayalı olarak elde edilmiştir.
SPIKE (DİKEN)	Amplifikasyon eğrisinin içinde ancak C <sub>T</sub> 'nin belirlendiği alanın dışında ham veri floresansında ani bir artış saptanmıştır.

# Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgi ve protokollerle ya da örnek ve test teknolojileriyle ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplandırmaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgileri için arka kapağa bakınız veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret ediniz).

## Yorum ve öneriler

### RNA izolasyonu

RNeasy Midi Kit ve Buffer EL kullanılarak yapılan tam kandan RNA saflaştırma işlemi için sorun giderme hakkında ilgili kit el kitaplarına başvurabilirsiniz.

### Elüatta yetersiz RNA

Yetersiz miktarda kan kullanılmış

Daha çok örnek kullanarak RNA izolasyonunu tekrarlayın. RNeasy MinElute Cleanup Kit'i (kat. no. 74204) kullanarak hem elüatları hem RNA'yı yıkamayı deneyin.

### Elüatta yetersiz RNA

Optimum hassasiyet için RNA konsantrasyonu 200 ng/µl olmalıdır

Örneği yoğunlaştırmak için RNeasy MinElute Cleanup Kit'i (kat. no. 74204) kullanın, ardından konsantrasyonu 200 ng/µl olarak ayarlayın.

### Standart, Kontrol veya IS-Cal saptanmadı

- Pipetleme hataları veya kullanılmayan reaktifler; tüp veya kuyu dönmüş  
Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
- Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması  
*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'i -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklayın ve qPCR Mix ABL1 ve qPCR Mix MbcR malzemelerini ışığa maruz bırakmayın.  
En fazla üç kez çözdürüp dondurmanız tavsiye edilir.
- ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'in son kullanma tarihi geçmiş  
Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.

## Yorum ve öneriler

### Sinyal yok, kontroller dahil

- |                                                                              |                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının 1. konumunda reaksiyon tüpü yok      | Her zaman test edilecek örneği rotorun 1. konumuna yerleştirin. Aksi takdirde cihaz kalibrasyonu gerçekleştirmez ve yanlış floresans verileri elde edilir.                                       |
| b) Pipetleme hataları veya kullanılmayan reaktifler; tüp veya kuyu dönmüş    | Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.                                                                                                            |
| c) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması                       | <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'i -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklayın; primerleri ve prob karışımlarını ışığa maruz bırakmayın. En fazla üç kez çözdürüp dondurmanız tavsiye edilir. |
| d) <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'in son kullanma tarihi geçmiş | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.                                                                    |
| e) Seçilen saptama kanalı yanlış                                             | Saptama kanalını Cycling Green (Yeşil Döngü) veya 470 nm/510 nm olarak ayarlayın.                                                                                                                |
| f) Veri alma programı yok                                                    | Döngü programını kontrol edin. Bkz. "Tablo 5," sayfa 35. PCR programında her birleştirme segmentinin sonunda "Single" (Tek) çekim modunu seçin.                                                  |

### Floresans yoğunluğu değişiyor

- |                                                                        |                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Pipetleme hataları veya kullanılmayan reaktifler; tüp veya kuyu dönmüş | Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın. |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|

### Floresans yoğunluğu çok düşük

- |                                                                              |                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Kit bileşenlerinin uygun olmayan şekilde saklanması                       | <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'i -30°C ila -15°C sıcaklıkta saklayın ve qPCR Mix ABL1 ve qPCR Mix MbcR malzemelerini ışığa maruz bırakmayın. En fazla üç kez çözdürüp dondurmanız tavsiye edilir. |
| b) <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'in son kullanma tarihi geçmiş | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.                                                                                  |
| c) Hedef RNA miktarı oldukça düşük                                           | Başlatmadan önce her zaman RNA konsantrasyonunu kontrol edin.                                                                                                                                                  |



## Yorum ve öneriler

### Negatif kontrol (H<sub>2</sub>O) pozitif sonuç veriyor

Çapraz kontaminasyon, reaktif kontaminasyonu, cihaz arızası, kuyu veya kapillerin ters dönmesi veya prob bozulması

Tüm kritik reaktifleri yenisiyle değiştirin veya yeni bir kit kullanın.

Çapraz kontaminasyonu önlemek için her zaman örnekleri, kit bileşenlerini ve sarf malzemelerini yaygın olarak kabul edilen uygulamalar çerçevesinde kullanın.

qPCR Mix ABL1 ve qPCR Mix Mbcr malzemelerini işığa maruz bırakmayın.

Floresan eğrilerindeki yanlış pozitif sonuçları kontrol edin.

Reaksiyon kurulumunu kontrol edin.

### Sonuçların yorumlanması

Rotor-Gene Q MDx cihazı ve Rotor-Gene Q yazılımı veya Rotor-Gene AssayManager yazılımı v2.1 ile ilgili sorun giderme bilgileri için lütfen ilgili kullanım kılavuzlarına bakın.

## Kalite Kontrol

Tüm kitin kalite kontrol işlemi, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu kit ISO 13485 standardına göre üretilmiştir. Analiz sertifikası talep üzerine [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/) adresinden alınabilir.

## Sınırlamalar

Kit, profesyonel kullanım için üretilmiştir.

Ürün yalnızca özel eğitim almış, moleküler biyoloji teknikleri konusunda öğrenim görmüş ve bu teknolojiyle ilgili bilgi sahibi olan personel tarafından kullanılmalıdır.

Bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır (bakınız "Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller", sayfa 12).

Tüm bileşenlerin kutu etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihleri geçmiş bileşenleri kullanmayın.

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit içinde tedarik edilmiş tüm reaktifler, yalnızca aynı kit ile tedarik edilen reaktiflerle birlikte kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Başka reaktiflerin veya diğer lotlardan alınan reaktiflerin kullanılması performansı düşürebilir.

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit, yalnızca Philadelphia kromozomlu pozitif (Ph+) p210 KML tanısı konan hastalardan alınan, potasyum EDTA (K<sub>2</sub>EDTA) içinde antikoagüle edilmiş tam kan örnekleriyle kullanım için doğrulanmıştır.

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'in performansı; RNeasy Midi Kit (kat. no. 75144), Buffer EL (kat. no. 79217) ve RNA temizleme ve konsantrasyon adımı için RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. no. 74204) kullanılarak belirlenmiştir.

Bu kitle PCR yapılması için yalnızca Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı onaylanmıştır.

Bu ürünün etiket dışı herhangi bir kullanımı ve/veya bileşenlerin modifikasyonu QIAGEN'in yükümlülüğünü ortadan kaldırır.

Oluşan herhangi bir diagnostik sonuç diğer klinik veya laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır.

QIAGEN performans çalışmaları kapsamında olmayan laboratuvarlarında kullanılan herhangi bir prosedür için sistem performansının doğrulanması kullanıcıların sorumluluğundadır.

# Performans Özellikleri

## Boş örnek sınırı

Boş örnek sınırı (limit of blank, LOB), sağlıklı tam kan örnekleri ile ilgili CLSI/NCCLS EP17-2A standardına uygun olarak belirlenmiştir (yedi örnek, 12 ölçüm/iki lot).

LOB değerinin, BCR-ABL1 Mbc transkriptinin 1,02 kopyasına eşit olduğu bulunmuştur.

## Tespit sınırı

Tespit sınırı (LOD veya analiz hassasiyeti), CLSI/NCCLS EP17-2A standardında tanımlanan "Klasik yaklaşım" baz alınarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, bilinen düşük pozitif örnekler (yedi örnek, 12 ölçüm/iki lot) analiz edilmiştir.

LOD değerinin, BCR-ABL1 Mbc transkriptinin 3,21 kopyasına veya %0,0030 IS-NCN değerine eşit olduğu bulunmuştur.

## Doğrusallık

Doğrusallık, CLSI/NCCLS EP6-A standardına uygun olarak, sağlıklı donörlerden ekstrakte edilen negatif RNA'nın hücre hattından alınan pozitif RNA ile art arda seyreltilmesi ile hazırlanmış dokuz farklı örnek üzerinde *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit'in bir lotunda belirlenmiştir. Bu tayin, üç farklı RNA girdisi için gerçekleştirilmiştir.

Miktar tayini yapılan RNA örneğinin konsantrasyonu testin önerilen girdisi olan 200 ng/ $\mu$ l değerine (toplam girdi 3  $\mu$ g) yakın olduğu sürece, BCR-ABL1 Mbc transkriptinin miktar tayini, LOD değerinden %56 IS-NCN değerine kadar doğrusaldır.

RNA girdisi azaldıkça doğrusallık aralığı düşebilir.

## Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

Kesinlik çalışması, CLSI/NCCLS EP5-A2 standardına göre yapılmıştır. Testler, dokuz örnek için 23 gün süresince 45 defa iki kopya halinde 45 çalışma yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir; yani her örnekte 90 ölçüm yapılmıştır.

Kesinlik sonuçları Tablo 12 üzerinde özetlenmiştir.

**Tablo 12. Kesinlik sonuçları**

Örnek	Ortalama BCR-ABL1 Mbc IS-NCN	SDR+	SDRUN++	SDTOTAL+++	CV <sub>TOPLAM</sub>
S1	64,5243	4,3105	12,3610	13,0910	%20,29
S2	36,1684	1,7104	5,9078	6,8581	%18,96
S3	6,4876	0,4231	0,7857	1,0941	%16,86
S4	0,7305	0,0512	0,0779	0,1178	%16,12
S5	0,0754	0,0068	0,0073	0,0133	%17,62
S6	0,0075	0,0016	0,0009	0,0022	%28,81
S7	0,0036	0,0014	0,0002	0,0014	%38,64
S8	0,0020	0,0010	0,0000	0,0010	%48,71
S9	0,0011	0,0007	0,0000	0,0007	%63,32

CV<sub>TOPLAM</sub>: Toplam hassasiyet için değişkenlik katsayısı (BCR-ABL1 Mbc IS-NCN); SD: standart sapma; R+: Tekrarlanabilirlik; ÇALIŞMA++: Çalışmalar arası yeniden üretilebilirlik; S: standart; TOPLAM+++: Toplam kesinlik (cihazlar arası, operatörler arası ve lotlar arası dahil).

## Engelleyici maddeler

Çalışma, NCCLS standardı EP7-A2 "Klinik Kimyada Engelleme Testi" içinde verilen öneriler baz alınarak tasarlanmıştır. Kan örneklerinde bulunması veya RNA saflaştırma esnasında örneklerle karışması olası olan aşağıdaki maddeler, PCR üzerindeki potansiyel etkisi için seçilmiştir (serbest bilirubin, bağlı bilirubin, hemoglobin [insan], serum albumin [insan], aşırı potasyum EDTA [K2-EDTA], etanol).

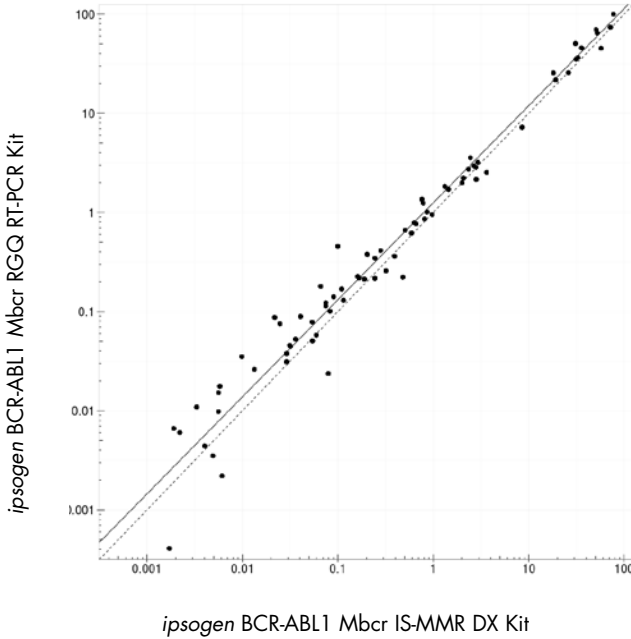
Alınan sonuçlar, bu maddelerle ilgili engelleme etkisi göstermemiştir.

## Klinik doğrulama ve yöntemlerin karşılaştırılması

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit'i alternatif yöntemlerle karşılaştırmak için iki çalışma yapılmıştır.

Çalışma 1: Periferal kandan alınan 76 adet RNA örneği *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ve *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX kiti ile analiz edilmiştir.

Deming regresyonu, her iki yöntemle ölçülen IS-NCN değerlerini karşılaştırmıştır. Şekil 9 üzerinde gösterildiği gibi, *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ile *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX ( $R^2= 0,97$ ) arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur.



Şekil 9. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ve *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit ile alınan IS-NCN grafiği.

Çalışma 2: Halihazırda Ph+ KML tanısı konmuş ve TKİ tedavisi görmekte olan hastaların periferal kanından alınan 39 RNA örneği, *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ve laboratuvarında geliştirilen bir test (referans yöntem) kullanılarak Fransa'daki bir klinik merkezinde analiz edilmiştir. Referans yöntem, bir dönüşüm katsayısı kullanarak uluslararası ölçeğe göre standardize edilmiş sonuçlar vermiştir.

Aşağıdaki ihtimal tablosu, her iki yöntemle bulunmuş klinik durumu karşılaştırmak için oluşturulmuştur. Şekil 10 üzerinde gösterildiği gibi, *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ile referans yöntem arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur (genel uyum = %97,4).

		Referans yöntem		n
		MR 4 yok	MR 4 veya altı	
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit	MR 4 yok	15	1	16
	MR 4 veya altı	0	23	23
n		15	24	39

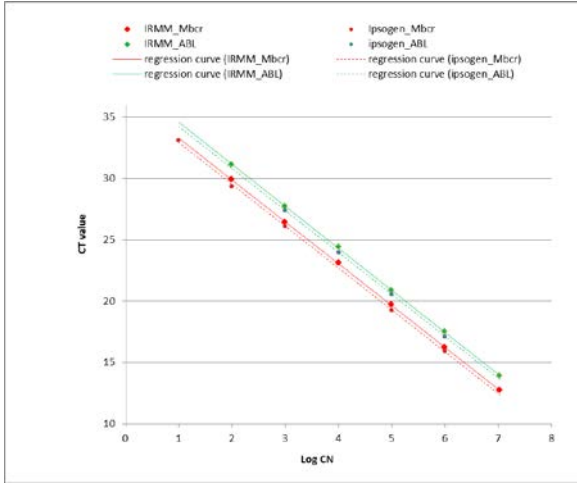
Şekil 10. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kiti ile Uluslararası Ölçeğe göre standardize edilmiş laboratuvarında geliştirilen testi karşılaştıran ihtimal tablosu.

## Uyumluluk çalışması: ERM-AD623 BCR-ABL1 tekli plazmid (IRMM) ile *ipsogen* tekli plazmid (QIAGEN) standartlarının karşılaştırması

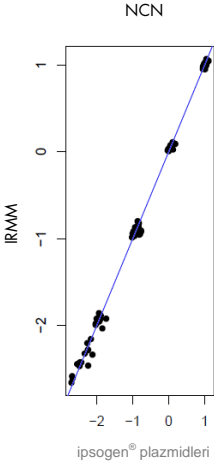
KML'de BCR-ABL1 Mbcrl'nin moleküler yanıtı ile ilgili en yakın zamanlı çalışma tanımları, Belçika'daki Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (Referans Materyaller ve Ölçümler Enstitüsü) European LeukemiaNet/European Treatment Outcome Study (ELN/EUTOS) (Avrupa Lösemi Ağı/Avrupa Çalışma Sonuçları Araştırması) Moleküler Takip Yürütme Kurulu tarafından yapılmıştır ve ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmid kullanımı önerilmektedir (9).

Bu öneriye uygun olarak QIAGEN, *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcrl RGQ RT-PCR Kit (24) CE (kat. no. 670923) içinde kullanılan *ipsogen* çok hedefli tekli plazmid ile ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmidini karşılaştırmıştır (IRMM).

Karşılaştırma; *ipsogen* kitlerinde ve National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (Ulusal Biyoloji Standartları ve Kontrol Enstitüsü) kaynaklı onaylı referans materyalde yer alan kontrol örnekleri üzerindeki BCR-ABL1 Mbcrl/ABL1 normalize kopya sayısı oranı (NCN) baz alınarak yapılmıştır ve iki standardın dilüsyonlarını (*ipsogen* veya ERM-AD623 BCR-ABL1) değerlendirmiştir (8). Sonuçlar, iki standart eğrinin paralel olduğunu (Şekil 11) ve NCN oranlarının benzer olduğunu (Şekil 12) göstermiştir.



Şekil 11. *ipsogen* ve ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmidlerinin karşılaştırması, standart eğrilerin paralel olduğunu göstermektedir.



Şekil 12. *ipsogen* ve ERM-AD623 plazmidleri benzer NCN değerlerine sahiptir.

QIAGEN araştırması, istatistiksel olarak önem arz eden bir fark olmadığı sonucuna varmıştır: ERM-AD623 BCR-ABL1 tekli plazmid ve *ipsogen* tekli plazmid standartları eşit sonuçlar vermektedir.



# Referanslar

## Alinti yapılan referanslar

1. Cross, N.C., White, H.E., Müller, M.C., Saglio, G., Hochhaus, A. (2012) Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 26, 2172.
2. Mahon, F.X., Etienne, G. (2013) Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? *Clin. Cancer Res.* 20, 310.
3. Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122, 872.
4. Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., et al. (2014) Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J. Clin. Oncol.* 32, 424.
5. Branford, S., Cross, N.C., Hochhaus, A., et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 20, 1925.
6. Branford, S., Fletcher, L., Cross, N.C., et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 112, 3330.
7. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 108, 28.
8. White, H.E., Matejtschuk, P., Rigsby, P., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* 116, e111.
9. Cross, N.C., White, H.E., Colomer, D., et al. (2015) Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 29, 999.

---

## Faydalı referanslar

Baccarani, M., et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.












Beillard, E., V.H., et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

Gabert, J., et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.

van der Velden, V.H., et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time qPCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.

# Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:

Sembol	Sembol tanımı
	Son kullanma tarihi
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Katalog numarası
	Lot numarası
	Materyal numarası
	Küresel Ticaret Parça Numarası
	Sıcaklık sınırlaması
	Üretici
	Işığa maruz bırakmayın
	Kullanma talimatlarına bakın
	Dikkat

# Sipariş Bilgileri

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: ABL1 ve BCR-ABL1 MbcR kantitatif Tekli Plazmid Standartları, Düşük ve Yüksek Pozitif Kontroller, IS-MMR Calibrator, qPCR mix ABL1, qPCR mix MbcR, Ters Transkripsiyon ve qPCR reaktifleri.	670923
<b>Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı: klinik uygulamalarda in vitro diagnostik olarak doğrulanmış gerçek zamanlı PCR analizi için</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve yüksek çözünürlüklü eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahil değildir.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve yüksek çözünürlüklü eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahildir.	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Rotor-Gene Q ile birlikte rutin testler için yazılım	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Tek bilgisayara yükleme için bir adet lisanslı yazılım	9025620

Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipette manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüplü 250 şerit ve kapakları.	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüplü ve kapaklı 10 x 250 şerit.	981106
<b>RNA izolasyonu</b>		
RNeasy Midi Kit	50 RNeasy Midi Dönel Kolon, Toplama Tüpleri (15 ml), RNaz İçermeyen Reaktifler ve Tamponlar. Total RNA saflaştırma için.	75144
Buffer EL	1000 ml Eritrosit Lizis Tamponu.	79217
RNeasy MinElute Cleanup Kit	50 RNeasy MinElute Dönel Kolon, Toplama Tüpleri (1,5 ml ve 2 ml), RNase İçermeyen Reaktifler ve Tamponlar. Küçük elüsyon hacimleriyle RNA temizleme ve yoğunlaştırma için.	74204

Güncel lisans bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabına veya kullanıcı kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

# El Kitabı Revizyon Geçmişi

Belge	Değişiklikler	Tarih
HB-1904_005	"Otomatik analiz: RGAM yazılımı ile 72 tıplık rotora sahip Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında qPCR" ve "Sonuçların RGAM Yazılımında Yorumlanması" bölümlerinin dahil edilmesi.	Haziran 2018

Bu ürün in vitro tanı amaçlı kullanım içindir. QIAGEN ürünleri tekrar satılamaz, yeniden satış için değiştirilemez veya QIAGEN'in yazılı izni olmadan ticari ürünler üretmek üzere kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgiler önceden bildirilmesiz değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilecek herhangi bir hata için hiçbir sorumluluk kabul etmez. Bu belgenin yayın tarihinde eksiksiz ve doğru olduğuna inanılmaktadır. Hiçbir durumda QIAGEN size karşı bu belgenin kullanımıyla ilgili veya bundan doğan rastlantısal, özel, çoklu veya dolaylı zarar için yükümlü olmaz.

QIAGEN ürünleri belirtilen özellikleri karşılamak üzere garanti edilmiştir. QIAGEN'in yegane yükümlülüğü ve müşterinin yegane telafi hakkı ürünlerin garanti edildiği şekilde uygulanmaması durumunda ürünlerin ücretsiz olarak değiştirilmesi ile sınırlıdır.

Bu ürünün satın alınması, satın alan tarafından insan in vitro diagnostığı için tanı amaçlı hizmetler yapılmasında kullanılmasına izin verir. Alımdan kazanılan bu özel kullanım hakkı dışında genel patent veya hiçbir türde başka lisans burada verilmemektedir.

Ticari markalar: QIAGEN®, *ipsogen*®, MinElute®, RNeasy®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); FAM™, SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); BHQ-1® (Biosearch Technologies, Inc); Excel® (Microsoft Corporation); TaqMan® (Roche Group).

#### ***ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi**

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürüne ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde test edilmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ya da tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Kitin satın alıcısı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atılmayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

1114278TR 06/2018 HB-1904-005 © 2016 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

---

Sipariş verme [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Teknik Destek [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Web sitesi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)