

Marts 2017

QIASure Methylation-test Brugsvejledning (håndbog)



Version 1

Til brug med Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

IVD Til in vitro-diagnostisk brug

CE

REF 616014



Self-screen B.V., Biohof 15-1, 1098 RX Amsterdam, HOLLAND

R3 **MAT** 1102323DA

Indhold

Tilsigtet anvendelse	4
Opsummering og forklaring	5
Procedureprincip	5
Medfølgende materialer	7
Kit-indhold	7
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	7
Advarsler og forholdsregler	9
Sikkerhedsinformationer	9
Generelle forholdsregler	9
Forholdsregler for AssayManager-profil	10
Opbevaring og håndtering af reagenser	11
Håndtering og opbevaring af prøver	12
Prøveforberedelse	13
Protokol: QIASure Methylation Test PCR i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	14
Fortolkning af resultater	26
Fejlfindingsvejledning	30
Begrænsninger	33

Ydelseegenskaber	34
Påvisningsgrænse (LOD).....	34
Linearitet	35
Præcision	35
Interfererende stoffer	36
Klinisk ydeevne	36
Robusthed	38
Referencer	40
Symboler	41
Kontaktoplysninger	42
Bestillingsinformation.....	43

Tilsigtet anvendelse

QIASure Methylation-test er en multiplex real-time-methyleringsspecifik PCR-analyse til påvisning af promoter-hypermethylering af generne *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*. Prøver, som kan testes med QIASure Methylation-testen omfatter bisulfitkonverteret DNA isoleret fra prøver, som er indsamlet på følgende måder:

- Cervikale prøver indsamlet med *digene*[®] HC2 DNA-indsamlingsenheden (indsamlet af lægen)
- Cervikale prøver indsamlet ved hjælp af en børstelignende indsamlingsenhed og placeret i PreservCyt[®]-opløsning (indsamlet af lægen)
- Vaginale prøver indsamlet ved hjælp af en børstelignende enhed (indsamlet af patienten selv)

Brugsindikationer:

1. Som en opfølgningstest til kvinder med en positiv HPV-test (human papillomavirus) for at bestemme behovet for henvisning til kolposkopi eller andre opfølgende procedurer.
2. Som en opfølgningstest til kvinder med pap-testresultater med atypiske pladeceller af ubestemt betydning (ASC-US) for at bestemme behovet for henvisning til kolposkopi eller andre opfølgende procedurer.

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, f.eks. teknikere og laboranter med kvalifikationer inden for in vitro-diagnostiske procedurer, molekylærbiologiske teknikker samt Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-systemet.

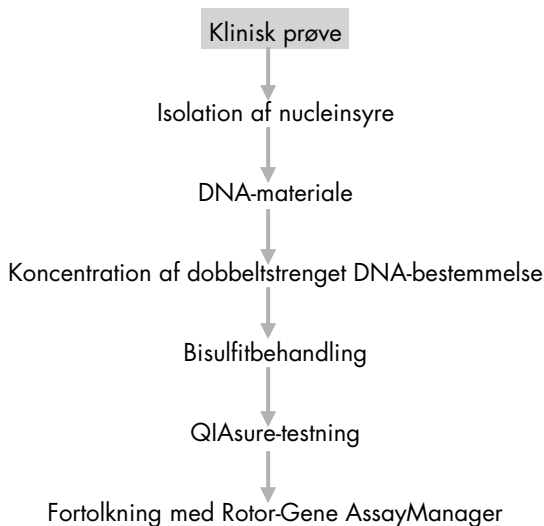
Opsummering og forklaring

DNA-methylering er en biokemisk proces, som er vigtig for normal udvikling i højere organismer (1). Det involverer tilsætning af en methylgruppe til den 5. position i pyrimidinringen i cytosin-nucleotid. Unormale mønstre af DNA-methylering spiller også en vigtig rolle i carcinogenese. I flere former for human cancer og cancer-cellelinjer, herunder cervikal cancer og endometriecancer, er promoter-hypermethylering af generne *FAM19A4* og/eller *hsa-mir124-2* blevet påvist (2-6). En analyse af promoter-methylering i værtsceller påviser specifikt cancer og såkaldte "fremskredne" CIN-læsioner (cervikal intraepitelial neoplas), som indeholder en cancerlignende methyleringsprofil og har en høj kortsigtet risiko for at udvikle sig til cancer (3, 7, 8). QIASure-analysen giver mulighed for påvisning af promoter-hypermethylering af generne *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* på bisulfitkonverteret DNA isoleret fra cervikale eller vaginale prøver ved hjælp af ACTB som en intern kvalitetskontrol af prøven.

Procedureprincip

QIASure Methylation-testen er en multiplex real-time PCR-test, som forstærker de methylerede promoter-områder i tumorsuppressor-generne *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* samt et methylerings-uspecifikt fragment af et referencegen. Kittet indeholder 2 rør af QIASure-masterblandingen og 2 rør af QIASure-kalibratoren. Masterblandingen er beregnet til forstærkning af bisulfitkonverteret DNA forberedt fra kliniske prøver. Masterblandingen indeholder primere og prober til målgenerne og referencegenet, der fungerer som kvalitetskontrol af den interne prøve. Kalibratoren er et lineariseret plasmid, der indeholder sekvenser af *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* og ACTB-amplikoner.

Rutediagram over proceduren



QIASure-analysen kører på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og Rotor-Gene AssayManager®-softwaren udfører automatisk dataanalyse og fortolkning. C_T -værdien (cyklustærsklen) repræsenterer det antal PCR-cykluser, der kræves for at påvise et fluorescenssignal over et baggrundssignal, som korrelerer med det antal målmolekyler, der er til stede i prøven. QIASure-analysen beregner ΔC_T -værdien som forskellen mellem C_T -værdien i *FAM19A4*- eller *hsa-mir124-2*-målene og C_T -værdien af referencen (ACTB). Denne ΔC_T er en relativ kvantitativ værdi for promoter-metyleringsniveauet i *FAM19A4* eller *hsa-mir124-2*-genet. For normalisering trækkes ΔC_T -værdien af en kalibratorprøve fra ΔC_T for *FAM19A4*- eller *hsa-mir124-2*-målene, hvilket resulterer i en $\Delta\Delta C_T$ -værdi (9). Kalibratoren er en standardiseret plasmid DNA-prøve med lavt kopiantal og et kendt kopiantal af de tre mål (dvs. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* og ACTB).

Medfølgende materialer

Kit-indhold

QIASure Methylation Test		72
Katalognr.		616014
Antal reaktioner		72
QIASure Master Mix (QIASure-masterblanding; 2 rør)	Brun farve	630 µl
QIASure Calibrator (QIASure-kalibrator; 2 rør)	Transparent farve	25 µl
QIASure Methylation Test Instructions for Use (engelsk håndbog)		1

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Forbrugsvarer og reagenser til prøveklargøring for selvindsamlede prøver

- Hologic PreservCyt®-opløsning

Forbrugsvarer og reagenser til bisulfitkonvertering af ekstraheret DNA

- EZ DNA Methylation Kit (EZ DNA-methyleringskit) (ZYMO Research, katalognr. D5001 eller katalognr. D5002)

Forbrugsvarer til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (båndrør og hætter, 0,1 ml; katalognr. 981103)
- Oprenset vand (f.eks. molekylærbiologisk kvalitet, destilleret eller deioniseret)

Udstyr

- Justerbare pipetter* beregnet til PCR (1-10 µl; 10-100 µl)
- Engangshandsker
- Bordcentrifuge* med en hastighed på > 10.000 o/min.
- Vortex-mixer*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, katalognr. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospektrometer (fluorospektrometer; Thermo Fisher Scientific, katalognr. ND-3300) eller tilsvarende*

Udstyr til real-time PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (katalognr. 9002033) eller Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrument (katalognr. 9002032)[†]
- Rotor-Gene AssayManager Core Application-softwareversion 1.0.x (hvor x er højere end eller lig med 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in installeret, version 1.0.x (hvor x er større end eller lige med 1)
- QIASure-analyseprofil (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (hvor Y er lig med eller højere end 1) til brug på bisulfitkonverteret DNA fra lægeindsamlede cervikale prøver
- Analyseprofilen QIASure self-collected brush specimen (QIASure-selvindsamlet børsteprøve) (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (hvor Y er lig med eller højere end 0) til brug på bisulfitkonverteret DNA fra selvindsamlede vaginale børsteprøver

* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

[†] Et Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med en produktionsdato fra januar 2010 eller senere. Produktionsdatoen findes under serienummeret på bagsiden af instrumentet. Serienummeret findes i formatet "mmåånnn", hvor "mm" står for produktionsmåneden i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den entydige instrumentidentifikator.

Advarsler og forholdsregler

Kun til in vitro-diagnostisk brug.

Sikkerhedsinformationer

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets, SDS'er). Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN®-kit og samtlige kitkomponenter.



QIAzure-masterblanding: Advarsel! Er under mistanke for at skade fertiliteten eller det ufødte barn. Brug beskytteshandsker/-tøj/-briller/ansigtsskærm. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp. Opbevares under lås. Bortskaf indholdet/holderen på et godkendt genbrugssted.

Generelle forholdsregler

Brug af PCR-test kræver god laboratoriepraksis, herunder vedligeholdelse af udstyr, som er beregnet til molekylærbiologi og overholder gældende regler og relevante standarder.

Vær altid opmærksom på følgende:

- Bær beskyttende talkumfrie engangshandsker, en laboratoriekittel og beskyttelsesbriller ved håndtering af prøver.
- Sørg for at forhindre mikrobiel og nukleasekontaminering (DNase) af prøven og kittet. DNase kan medføre forringelse af DNA-skabelonen.

- Undgå DNA- eller PCR-produktafsmittende kontaminering, hvilket kan medføre et falsk positivt signal.
- Brug altid DNase-frie pipetter med engangsspidser og aerosolbarrierer.
- Reagenser af QIASure-analyse fortyndes optimalt. Fortynd ikke reagenserne yderligere, da dette kan resultere i tab af ydelse.
- Alle reagenser, der leveres med QIASure-kittet, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme kit. Et reagens fra ét kit må ikke erstattes med det samme reagens fra et andet QIASure-kit, heller ikke fra det samme batch, da dette kan påvirke ydeevnen.
- Se brugervejledningen til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet for at få flere oplysninger om advarsler, forholdsregler og procedurer.
- Ændring af inkuberingstider og temperaturer kan resultere i forkerte eller afvigende data.
- Brug ikke komponenter fra kittet, som har overskredet deres udløbsdato, eller som ikke har været opbevaret korrekt.
- Minimer komponenternes eksponering for lys: Reaktionsblandinger kan ændres som følge af eksponering.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre kontaminering af blandingerne med de syntetiske materialer, der findes i PCR-reagenserne.
- Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.

Forholdsregler for AssayManager-profil

Der kræves forskellige AssayManager-profiler til forskellige prøvetyper. Sørg for at anvende den korrekte profil til den prøvetype, der skal testes, som angivet nedenfor:

- Analyseprofilen "QIASure cervical scrapes" (QIASure-cervikale udskrabninger; fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) skal bruges til test af bisulfitkonverteret DNA fra lægeindsamlede cervikale prøver

- Analyseprofilen "QIASure self-collected brush specimens" (QIASure-selvindsamlede børsteprøver; fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) skal bruges til test af bisulfitkonverteret DNA fra selvindsamlede vaginale børsteprøver

Opbevaring og håndtering af reagenser

Forsendelsesbetingelser

QIASure Methylation-testen forsendes på tøris. Hvis nogen af komponenterne i QIASure Methylation-testen ikke er frosne ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en følgeseddel, håndbøger eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Opbevaringsbetingelser

QIASure Methylation-testen skal straks efter modtagelse opbevares ved -30 til -15 °C i en fryser med konstant temperatur og beskyttes mod lys.

Stabilitet

Ved opbevaring under de angivne opbevaringsforhold er QIASure Methylation-testen holdbar, indtil udløbsdatoen på æskens etiket.

Når de er åbnet, kan reagenser opbevares i deres originale emballage ved -30 til -15 °C. Undgå gentagen optøning og indfrysning. Et reagens må højst nedfryses og optøs 3 gange.

- Bland forsigtigt ved at vende røret 10 gange, og centrifuger alle rør, før de åbnes.
- Udløbsdatoer for hvert reagens er angivet på de enkelte komponents etiketter. Under de korrekte opbevaringsforhold vil produktet bevare ydeevnen under holdbarhedstiden, så længe man anvender de samme komponentbatches.

Håndtering og opbevaring af prøver



Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Cervikale prøver

QIASure-kittet er beregnet til brug med bisulfitkonverterede genomiske DNA-prøver fra cervikale prøver. Godkendte indsamlingsmedier til cervikale prøver (udskrabninger) er PreservCyt®-indsamlingsmedium og digene-STM (Specimen Transport Medium). Den optimale opbevaringstemperatur for de kliniske prøver er 2-8 °C ved modtagelse i laboratoriet. Under disse opbevaringsforhold er prøver i PreservCyt-indsamlingsmedium holdbare i 3 måneder inden DNA-ekstrahering.

Bemærk: Cervikale prøver i STM kan sendes ved 2-30 °C for dag til dag-levering til testlaboratoriet og fryses igen ved -20 °C efter modtagelse.

Selvindsamlede vaginale børsteprøver

QIASure Methylation-testen er beregnet til brug med bisulfitkonverterede genomiske DNA-prøver, der er ekstraheret fra selvindsamlede vaginale børsteprøver. Selvindsamlede vaginale børsteprøver kan indsamles og sendes tørre eller i saltvandsopløsning (0,9 w/v NaCl) og opbevares efter modtagelse i laboratoriet i et PreservCyt-indsamlingsmedium. Prøver i PreservCyt-indsamlingsmedium kan opbevares ved 2-8 °C eller stuetemperatur i op til 3 måneder.

Genomisk DNA-prøver

Når genomisk DNA er ekstraheret, kan DNA-prøver opbevares og sendes ved -30 til -15 °C i op til 12 måneder.

Prøveforberedelse

QIASure Methylation-testen er blevet godkendt til brug sammen med bisulfitkonverteret genomisk DNA hentet fra cervikale prøver ved hjælp af EZ DNA Methylation™-kittet fra ZYMO Research.

DNA-ekstrahering

Standard DNA-ekstraheringskit (f.eks. kit baseret på kolonner og magnetiske kugler) er kompatible med QIASure Methylation-testen.

Kvalificering og kvantificering af DNA

Før bisulfitkonvertering af DNA skal man måle DNA-koncentrationen. Passende systemer til måling af DNA-koncentrationer er Qubit Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (begge er fra Thermo Fisher Scientific) eller tilsvarende.

Optimalt DNA-input for bisulfitkonverteringsområder fra 100 ng til 2 µg, hvor 200 ng anbefales til bisulfitkonvertering. Hvis DNA-koncentrationen er for lav til bisulfitkonvertering, skal du gentage DNA-ekstrahering med en højere inputvolumen i den kliniske prøve eller eluere DNA'et i en mindre elutionsvolumen.

Bisulfitkonvertering af ekstraheret prøve-DNA

EZ DNA Methylation-kittet fra ZYMO Research er kompatibelt med QIASure Methylation-testen.

Bemærk: I overensstemmelse med EZ DNA Methylation-kittet må det maksimale input af prøve-DNA ikke overstige 2 µg for at nå en tilstrækkelig høj konverteringseffektivitet (> 98 %).

Reaktionen med bisulfitkonvertering skal udføres i et dertil indrettet område med afstand til opbevaringen og dispenseringen af QIASure-masterblandingen for at undgå kontaminering af reagenserne.

Inputtet i QIASure-reaktionen er 2,5 µl bisulfitkonverteret DNA.

Hvis den interne prøve kvalitetskontrol er negativ (dvs. ACTB C_T-værdierne er > 26,4), resulterer forberedelsen af bisulfitkonverteret DNA i materiale af utilstrækkelig kvantitet og/eller kvalitet og er ugyldig. Gentag bisulfitkonverteringsreaktionen med et højere input af prøve-DNA, og/eller gentag DNA-isolering med et højere input af cervikal prøve for at opnå en ACTB C_T-værdi, som er inden for det gyldige område.

Bisulfitkonverteret DNA kan opbevares i op til 24 timer ved 2 til 8 °C, op til 5 dage ved -25 til -15 °C og op til 3 måneder under -70 °C. Gentagen nedfrysning/optøning af det bisulfitkonverterede DNA skal til enhver tid undgås. For at bevare en tilstrækkelig kvalitet må antallet af nedfrysnings- og optøningscyklusser ikke overstige tre.

Protokol: QIASure Methylation Test PCR i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet*

Vigtige anvisninger før start

- Sørg for at være fortrolig med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, før protokollen påbegyndes. Se brugervejledningen til instrumentet (katalognr. 9002033 eller 9002032).

* Et Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med en produktionsdato fra januar 2010 eller senere. Produktionsdatoen findes under serienummeret på bagsiden af instrumentet. Serienummeret findes i formatet "mmåånnn", hvor "mm" står for produktionsmåneden i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den entydige instrumentidentifikator.

- Rotor-Gene AssayManager v1.0 muliggør automatisk fortolkning af PCR-resultater. QIASure-kittet skal køres på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet ved hjælp af Rotor-Gene AssayManager v1.0. Sørg for at være fortrolig med Rotor-Gene AssayManager v1.0 (katalognr. 9022739) og Epsilon Plug-In, og se brugervejledningerne til begge.
- Der kræves forskellige Rotor-Gene AssayManager v1.0-analyseprofiler til forskellige prøvetyper. Sørg for at anvende den korrekte profil til den prøvetype, der skal testes, som angivet nedenfor:
 - Analyseprofilen "QIASure cervical scrapes" (QIASure-cervikale udskrabninger; fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) skal bruges til test af bisulfitkonverteret DNA fra lægeindsamlede cervikale prøver
 - Analyseprofilen "QIASure self-collected brush specimens" (QIASure-selvindsamlede børsteprøver; fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) skal bruges til test af bisulfitkonverteret DNA fra selvindsamlede vaginale børsteprøver

Bemærk: Der kan kun testes én prøvetype pr. eksperiment. De enkelte analyseprofiler er blevet optimeret for hver prøvetype, og det er vigtigt, at kunderne vælger den korrekte analyseprofil for at opnå optimale resultater for hver specifik prøvetype.

Ting, der skal gøres før start

- Rotor-Gene AssayManager-softwareversion v1.0.x (hvor x er større end eller lig med 4) skal installeres på den computer, som er tilsluttet Rotor-Gene Q MDx. Se detaljer omkring installationen af Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application-software i brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application.
- QIASure Methylation-testen kræver en bestemt plug-in, som kaldes "Epsilon Plug-in" (version 1.0.1 eller nyere). Denne plug-in kan hentes fra QIAGEN-webstedet: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-assaymanager#resources>. Denne plug-in skal være installeret på en computer, som allerede har Rotor-Gene AssayManager version 1.0.x (hvor x er større end eller lig med 4) installeret.
- QIASure Methylation-testen kræver en analysespecifik profil, som skal køres sammen med Rotor-Gene AssayManager v1.0-softwaren. Denne analyseprofil indeholder alle

de parametre, der er nødvendige for at køre en cyklus og analysere eksperimentet.

Der er 2 QIASure-analyseprofiler:

1. Analyseprofilen "QIASure cervical scrapes" (QIASure-cervikale udskrabninger; fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) svarer til lægeindsamlede cervikale prøver
2. Analyseprofilen "QIASure self-collected brush specimens" (QIASure-selvindsamlede børsteprøver; fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) svarer til selvindsamlede vaginale børsteprøver. Disse profiler kan hentes fra QIASure Methylation-testens websted: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Analyseprofilen skal importeres i Rotor-Gene AssayManager-softwaren.

Bemærk: QIASure-kittet kan kun køre, hvis der er programmeret bestemte konfigurationsindstillinger i Rotor-Gene AssayManager v1.0.

For opnåelse af processikkerhed i hele systemet skal følgende nødvendige konfigurationsindstillinger være indstillet for den lukkede tilstand:

- "Material number required" (Materialenummer påkrævet)
- "Valid expiry date required" (Gyldig udløbsdato påkrævet)
- "Lot number required" (Lotnummer påkrævet)


Installation af Epsilon Plug-in og import af analyseprofilen

Installationen og importen af Epsilon Plug-in og analyseprofilen er beskrevet i brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager Core Application og brugervejledningen til Epsilon Plug-In.

- Hent både Epsilon Plug-in og den nyeste version af QIASure-analyseprofilen fra QIAGEN-webstedet.
- Start installationsprocessen ved at dobbeltklikke på filen **EpsilonPlugin.Installation.msi** og følge installationsinstruktionerne. Se en detaljeret beskrivelse af denne proces i afsnittet "Installation af plug-ins" i *AssayManager Core Application User Manual* (brugervejledningen til AssayManager Core Application).

Bemærk: For at sikre processen i hele systemet skal du vælge fanen **Settings** (Indstillinger) og markere afkrydsningsfelterne for **Material number required** (Materialenummer påkrævet), **Valid expiry date required** (Gyldig udløbsdato påkrævet) og **Lot number required** (Lotnummer påkrævet) for den lukkede tilstand (afsnittet Arbejdsliste). Hvis disse ikke er aktiveret (afkrydset), skal du klikke for at aktivere dem.

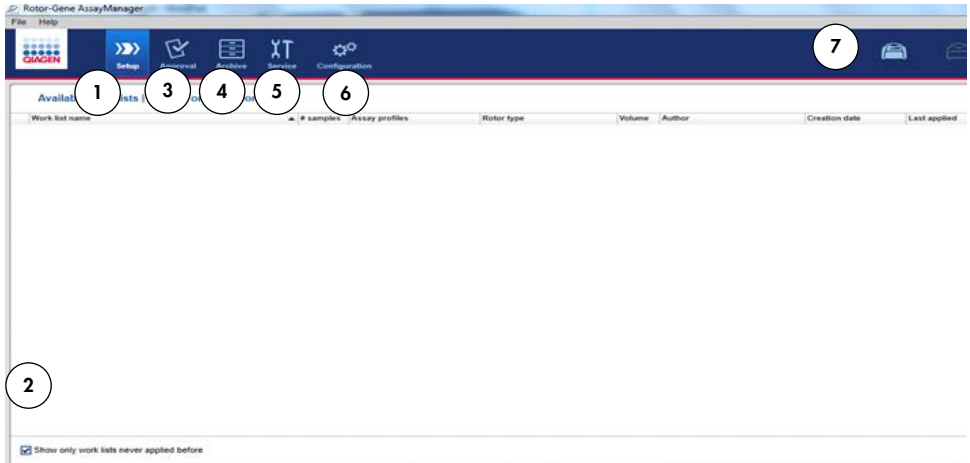
- Efter vellykket installation af plug-in'en skal en person med administratorrettigheder til Rotor Gene AssayManager-softwaren importere analyseprofilen AP_QIASure_V1_0_Y.iap på følgende måde.

1. Åbn Rotor-Gene AssayManager-softwaren ved at klikke på ikonet . Rotor-Gene AssayManager-vinduet åbnes (se figur 1).



Figur 1. Loginskærm til Rotor-Gene AssayManager.

2. Log på Rotor-Gene AssayManager med dit bruger-id og din adgangskode. Tilstanden "Closed" (Lukket) må ikke ændres. Klik på **OK**. Skærbilledet Rotor-Gene Assay Manager åbnes (se herunder).



- 1 Fanen **Set-up** (Opsætning). Med denne fane kan du administrere eller anvende arbejdslistes.
- 2 Ved aktivering af denne indstilling vises der kun nye arbejdslistes.
- 3 Fanen **Approval** (Godkendelse). Med denne fane kan du finde tidligere eksperimenter (kørsler).
- 4 Fanen **Archive** (Arkiv). Giver dig mulighed for at finde gamle eksperimenter (kørsler), som allerede er godkendt.
5. Vælg konfigurationsmiljøet.
6. Vælg fanen **Assay Profiles** (Analyseprofiler).
5. Klik på **Import** (Importér).
- 5 Fanen **Service**. Viser en rapport over et revisionspor for hver fil, der er genereret af softwaren.
- 6 Fanen **Configuration** (Konfiguration). Giver mulighed for konfiguration af alle softwareparametre.
- 7 Rotor-Gene Q MDx-ikoner.



Ikke tilsluttet



Tilsluttet

-
6. Vælg analyseprofilen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap til cervikale prøver og/eller analyseprofilen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap til import i dialogboksen, og klik på **Open** (Åbn).
 7. Når analyseprofilen er importeret, kan den bruges i miljøet "Setup" (Opsætning).
Bemærk: Man kan ikke importere den samme version af en analyseprofil to gange.

Prøvebehandling på Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med en rotor med 72 rør

Der kan testes op til 70 bisulfitkonverterede DNA-prøver inden for samme kørsel (eksperiment) udover en kalibrator og ikke-skabelon-kontrol. Skemaet i tabel 1 viser et eksempel på isætningsblokken eller rotoropsætningen for en kørsel med QIASure Methylation-testen. Tallene angiver positioner i isætningsblokken og indikerer den endelige rotorposition.

Tabel 1. Opsætning af plade og rotor for en kørsel med QIASure-kittet på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet

Bånd	Rørposition	Prøvenavn	Bånd	Rørposition	Prøvenavn	Bånd	Rørposition	Prøvenavn
1	1	Kalibrator	7	25	Prøve 23	13	49	Prøve 47
	2	NTC		26	Prøve 24		50	Prøve 48
	3	Prøve 1		27	Prøve 25		51	Prøve 49
	4	Prøve 2		28	Prøve 26		52	Prøve 50
2	5	Prøve 3	8	29	Prøve 27	14	53	Prøve 51
	6	Prøve 4		30	Prøve 28		54	Prøve 52
	7	Prøve 5		31	Prøve 29		55	Prøve 53
	8	Prøve 6		32	Prøve 30		56	Prøve 54
3	9	Prøve 7	9	33	Prøve 31	15	57	Prøve 55
	10	Prøve 8		34	Prøve 32		58	Prøve 56
	11	Prøve 9		35	Prøve 33		59	Prøve 57
	12	Prøve 10		36	Prøve 34		60	Prøve 58
4	13	Prøve 11	10	37	Prøve 35	16	61	Prøve 59
	14	Prøve 12		38	Prøve 36		62	Prøve 60
	15	Prøve 13		39	Prøve 37		63	Prøve 61
	16	Prøve 14		40	Prøve 38		64	Prøve 62
5	17	Prøve 15	11	41	Prøve 39	17	65	Prøve 63
	18	Prøve 16		42	Prøve 40		66	Prøve 64
	19	Prøve 17		43	Prøve 41		67	Prøve 65
	20	Prøve 18		44	Prøve 42		68	Prøve 66
6	21	Prøve 19	12	45	Prøve 43	18	69	Prøve 67
	22	Prøve 20		46	Prøve 44		70	Prøve 68
	23	Prøve 21		47	Prøve 45		71	Prøve 69
	24	Prøve 22		48	Prøve 46		72	Prøve 70



Rørene skal indsættes i rotoren som vist i tabel 1. Den automatiske analyse, som er indstillet i analyseprofilen, er baseret på denne organisering. Hvis der anvendes et andet layout, vil resultaterne være afvigende.

Bemærk: Udfyld alle ubrugte positioner med tomme rør.

PCR på Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med en rotor med 72 rør

1. Opret en arbejdsliste til den prøve, som skal behandles, på følgende måde:

- Tænd for Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.
- Åbn Rotor-Gene AssayManager-softwaren, og log på som bruger med operatørrolle i den lukkede tilstand.
- Klik på **New work list** (Ny arbejdsliste) i arbejdslistestyningen (miljøet "Setup" (Opsætning)).
- Vælg **QIASure assay profile** (QIASure-analyseprofil) på listen over tilgængelige analyseprofiler.

Bemærk: Analyseprofilen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap svarer til cervikale prøver. Analyseprofilen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap svarer til selvindsamlede vaginale børsteprøver.

Bemærk: Der kan kun testes én prøvetype pr. eksperiment.

- Klik på **Move** (Flyt) for at overføre den valgte analyseprofil til listen "Selected assay profiles" (Valgte analyseprofiler). Analyseprofilen bør nu vises på listen "Selected assay profiles" (Valgte analyseprofiler).
- Indtast prøveantallet i det tilsvarende felt.
- Indtast de følgende QIASure-kitoplysninger, som er trykt på æskens låg.
- Materialenummer: 1102417
- Gyldig udløbsdato med formatet ÅÅÅÅ-MM-DD
- Lot-nummer

- Vælg trinnet **Samples** (Prøver). Der vises en liste med prøveoplysninger på AssayManager-skærmbilledet. Denne liste repræsenterer rotorens forventede layout.
- Indtast prøveidentifikationsnumrene på denne liste samt eventuelle valgfrie prøveoplysninger som en kommentar for hver prøve.
- Vælg trinnet **Properties** (Egenskaber), og indtast et arbejdslistenavn (figur 2).

Figur 2. Egenskaber.

- Markér afkrydsningsfeltet **is applicable** (er gældende), og klik på **Apply** (Anvend).
- Gem arbejdslisten.

Arbejdslisten kan udskrives, hvilket kan være en hjælp til forberedelse og opsætning af PCR. For at udskrive arbejdslisten skal du klikke på **Print work list** (Udskriv arbejdsliste). Prøveoplysningerne er inkluderet som en del af denne arbejdsliste.

Bemærk: Arbejdslisten kan oprettes, når kørslen er indstillet i instrumentet, eller arbejdslisten kan gemmes, før prøverne tilføjes i instrumentet.

2. Opsætning af QIASure-kørslen.

For at minimere risikoen for kontaminering af PCR-reaktionen anbefales det kraftigt, at man bruger et PCR-kabinet med kapacitet til UV-bestråling.

Dispensering af QIASure-masterblandingen skal udføres i et område, som er adskilt fra det område, hvor DNA-bisulfitkonverteringsreaktionen udføres.

Rengør bordområdet, pipetter og rørracket, før det bruges sammen med en DNA-nedbrydningsopløsning for at forhindre kontaminering af skabelon eller nuklease.

Bemærk: Udskift spidserne mellem hvert rør for at undgå en uspecifik kontaminering af skabelonen eller reaktionsblandingen, hvilket kan medføre falsk-positive resultater.

- Optø QIASure-masterblandingen og QIASure-kalibratoren helt, og beskyt så vidt muligt QIASure-masterblandingen mod lys.

Bemærk: For at undgå forringelse af materialet må optøningstrinnet må ikke overskride 30 minutter.

- Bland forsigtigt ved at vende røret 10 gange, og centrifuger derefter kort før brug.
- Dispensér 17,5 µl brugsklar QIASure-masterblanding i passende båndrør. Reaktionsopsætningen kan udføres ved stuetemperatur.
- Sæt QIASure-masterblandingen tilbage i fryseren for at undgå forringelse af materialet.
- Transportér rørene til adskilte områder for at dispensere analysekontrollerne og de bisulfitkonverterede prøver.
- Tilsæt 2,5 µl vand i **no template control (NTC)** (ikke-skabelon-kontrol) til position 2 (se tabel 1 ovenfor). Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.
- Tilsæt 2,5 µl QIASure-kalibrator i position 1 (se tabel 1 ovenfor). Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned, og luk røret med et låg.
- Tilsæt 2,5 µl bisulfitkonverteret DNA i det tilsvarende rør. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.
- Når et sæt af 4 rør er blevet fyldt, skal der sættes låg på rørene.

Bemærk: PCR-rørene kan opbevares i 30 minutter mellem pipettering af prøver i PCR-rørene og starten af eksperimentet i maskinen ved 2-8 °C i mørke.

- Sæt QIASure-kalibratoren tilbage i fryseren for at undgå forringelse af materialet.

Bemærk: Udskift spidserne mellem hvert rør for at undgå en uspecifik kontaminering af skabelonen eller reaktionsblandingen, hvilket kan medføre falsk-positive resultater.

3. Forbered Rotor-Gene Q MDx, og start kørslen (eksperimentet) som følger:

- Placer en rotor med 72 brønde i rotorholderen.

- Fyld rotoren med båndrør i de tildelte positioner med start ved position 1 som vist i tabel 1 (side 20) med tomme båndrør med låg placeret i alle ubrugte positioner.

Bemærk: Sørg for, at det første rør sidder i position 1, og at båndrørene er placeret i korrekt retning og position som vist i tabel 1 (side 20).

- Sæt låseringen på.
- Sæt rotoren i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og sæt låseringen på, og luk instrumentets låg.
- I Rotor-Gene AssayManager v1.0-softwaren skal du enten vælge den tilsvarende arbejdsliste fra arbejdslistestyringen og klikke på **Apply** (Anvend), eller, hvis arbejdslisten stadig er åben, klikke på **Apply** (Anvend).

Bemærk: Hvis arbejdslisten for kørslen ikke er blevet oprettet, skal du logge på Rotor-Gene AssayManager v1.0 og følge trin 1, før du fortsætter.

- Indtast navnet på kørslen (eksperimentet).
- Vælg den cyklus, der skal anvendes i "Cycler selection" (Valg af cykler).
- Kontrollér, at låseringen er sat korrekt på, og bekræft på skærmen, at låseringen er påsat.
- Klik på **Start experiment** (Start eksperiment).

4. QIASure Methylation-testen bør starte.

5. Når kørslen er færdig, skal du klikke på **Finish run** (Afslut kørsel).

6. Frigiv og godkend kørslen.

- Brugere, der er logget på med rollen "Approver" (Godkender), skal klikke på **Release and go to approval** (Frigiv og gå til godkendelse).

- Brugere, der er logget på med rollen "Operator" (Operatør), skal klikke på **Release** (Frigiv).

7. Frigiv resultater.

- Hvis der blev klikket på **Release and go to approval** (Frigiv og gå til godkendelse), vises resultaterne for eksperimentet.

- Hvis der blev klikket på **Release** (Frigiv) af en bruger med brugerrolle, skal en person med rollen "Approver" (Godkender) logge på og vælge miljøet "Approval" (Godkendelse).
- Filtrer den analyse, der skal godkendes, ved at vælge filterindstillingerne og klikke på **Apply** (Anvend).
- Gennemse resultaterne, og godkend resultaterne for hver testprøve.

I tabellen "Results" (Resultater) skal du rulle ned til den prøve, der skal godkendes. Hvert prøveresultat, som skal godkendes, har tre alternativknapper for enden af den relevante række.

Du skal enten **accept** (acceptere) eller **reject** (afvise) resultatet af en prøve.

Bemærk: Et resultat, der automatisk er indstillet til "INVALID" (Ugyldigt) af Rotor-Gene AssayManager, kan ikke længere konverteres til et gyldigt resultat, heller ikke selvom resultatet er afvist.

Valgfrit: Indtast en kommentar i kolonnen "Sample comment" (Prøvekommentar).

- Klik på **Release/Report data** (Frigiv/rapportdata)
- Klik på **OK**. Rapporten genereres i Adobe Portable Document-format (.pdf) og gemmes automatisk i den foruddefinerede mappe. Denne mappesti er som standard:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Bemærk: Denne sti og mappe kan ændres i miljøet "Configuration" (Konfiguration).

- Gå til fanen **Archive** (Arkiv) for at eksportere .rex-filen, som svarer til rådataene. Find dit eksperiment ved hjælp af filterindstillingerne, og klik på **show assays** (Vis analyser). Klik derefter på **Export .rex file** (Eksportér .rex-fil), og gem den ved at klikke på **OK**. Softwaren gemmer automatisk .rex-filen i den følgende foruddefinerede mappe:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments

Bemærk: Denne sti og mappe kan ændres under fanen "specify the .rex file export destination" (angiv .rex-filens eksportdestination).

Bemærk: For fejlfinding kræves der en supportpakke fra kørslen. Supportpakker kan genereres fra godkendelses- eller arkiveringsmiljøet. Se *Rotor-Gene AssayManager Core*

Application User Manual (brugervejledning til Rotor-Gene AssayManager Core Application), "Troubleshooting" (Fejlfinding), "Creating a support package" (Oprettelse af en supportpakke) på <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-assaymanager#resources>. Derudover kan revisionssporet fra tidspunktet for hændelsen ± 1 dag være nyttigt. Revisionssporet kan hentes i miljøet Service (brugervejledning til Rotor-Gene AssayManager Core Application).

8. Tøm Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og bortskaf båndrørene i henhold til de lokale sikkerhedsbestemmelser.

Fortolkning af resultater

Analysen er fuldstændig automatisk.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyserer først forstærkningskurver og kan ugyldiggøre uoverensstemmende kurver afhængigt af deres form og støjamplitude. Hvis dette er tilfældet, knyttes der et flag til den ugyldige kurve (se tabel 2).

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyserer derefter kørselskontrollerne.

- Kalibrator
- NTC

Bemærk: Den rapport, der genereres ved afslutningen af kørslen, viser de resultater, der er opnået på kørselskontroller med ugyldiggørende flag foran de ugyldige data.

Hvis alle kontrollerne i kørslen er overensstemmende, analyserer Rotor-Gene AssayManager de ukendte prøver.

Tabel 2 viser de ugyldiggørende prøveflag, som kan knyttes til et individuelt rør under analysen af Rotor-Gene AssayManager v1.0, sammen med en forklaring på, hvad det pågældende flag betyder.

Tabel 2. Ugyldiggørende prøvflag og beskrivelse af begreber

Flag	Adfærd	Beskrivelse
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ugyldig	Målværdien er højere end det angivne område. Dette kan være en C_T -værdi, slutpunktsfluorescens, koncentration eller beregnet værdi, f.eks. gennemsnitlig C_T -værdi eller ΔC_T .
ASSAY_INVALID	Ugyldig	Analysen er ugyldig, da mindst én ekstern kontrol er ugyldig.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Ugyldig	Målværdien er lavere end det angivne område. Dette kan være en C_T -værdi, slutpunktsfluorescens, koncentration eller beregnet værdi, f.eks. gennemsnitlig C_T -værdi eller ΔC_T .
CONSECUTIVE_FAULT	Ugyldig	Det mål, som blev brugt til beregning af dette mål, er ugyldigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Ugyldig	Amplifikationskurven for rådataene viser en form, der afviger fra den fastsatte adfærd for denne analyse. Der er en høj risiko for forkerte resultater eller misfortolkning af resultater.
FLAT_BUMP	Ugyldig	Amplifikationskurven for rådataene viser en form, der ligner en flad bule og afviger fra det fastsatte adfærd for denne analyse. Der er en høj risiko for forkerte resultater eller misfortolkning af resultater (f.eks. forkert bestemmelse af C_T -værdi).
IN_ACCEPTED_RANGE	Gyldig	NTC viser signal C_T -værdier over 36 for mål-ACTB.
INVALID_CALCULATION	Ugyldig	Beregningen for dette mål mislykkedes.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Ugyldig	Amplifikationskurven krydser tærsklen mere end én gang. En entydig C_T -værdi kan ikke bestemmes.
NO_BASELINE	Ugyldig	Der er ikke fundet nogen startværdi for den indledende baseline.
NO_CT_DETECTED	Variabel	Der er ikke påvist nogen C_T -værdi for dette mål.
NO_VALUE	Ugyldig	Målet har ingen værdi men forventes at have en. Denne værdi behøver ikke at være inden for et bestemt område. Dette kan være en C_T -værdi, slutpunktsfluorescens, koncentration eller beregnet værdi (f.eks. gennemsnitlig C_T -værdi eller ΔC_T).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Advarsel	Afvigelse under normaliseringsproceduren. Amplifikationskurven vises med en standard-normalisering. Resultaternes korrekthed skal kontrolleres manuelt.
OTHER_TARGET_INVALID	Ugyldig	Et andet mål for den samme prøve er ugyldig.

SATURATION	Ugyldig	Rådatafluorescensen mættes kraftigt, før amplifikationskurven vendepunkt.
SATURATION_IN_PLATEAU	Advarsel	Rådatafluorescensen mættes i amplifikationskurvens plateau fase.
SPIKE	Advarsel	En stigning i rådatafluorescensen påvises i amplifikationskurven men uden for det område, hvor C_T -værdien bestemmes.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Ugyldig	En stigning påvises i amplifikationskurven tæt på C_T -værdien.
STEEP_BASELINE	Ugyldig	En stærkt stigende baseline for rådatafluorescensen påvises i amplifikationskurven.
STRONG_BASELINE_DIP	Ugyldig	Et stærkt fald i baselinen for rådatafluorescensen påvises i amplifikationskurven.
STRONG_NOISE	Ugyldig	Stærk støj uden for amplifikationskurvens vækstfase påvises.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Ugyldig	Stærk støj påvises i amplifikationskurvens vækstfase (den eksponentielle fase).
UNCERTAIN	Variabel	Resultater fra AUDAS (Automatic Data Scan) strider mod resultater fra kerneanalysen. En entydig automatisk vurdering af dataenes gyldighed er ikke mulig.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variabel	En C_T -værdi påvises for et mål, som ikke skal forstærkes.
UNEXPECTED_VALUE	Ugyldig	Målet har en værdi, men det er ikke en forventet værdi. Dette kan være en C_T -værdi, slutpunktsfluorescens, koncentration eller beregnet værdi, f.eks. gennemsnitlig C_T -værdi eller ΔC_T .
UPSTREAM	Variabel	<p>Prøvestatus blev indstillet til "Invalid" (Ugyldig) eller "Unclear" (Utydelig) af en upstream-proces (f.eks. QIASymphony).</p> <p>Bemærk: For prøver, der er markeret som utydelige, defineres adfærden i Rotor-Gene AssayManager i miljøet "Configuration" (Konfiguration) i AssayManager-softwaren. Flagene "Invalid" (Ugyldig) fra upstream-processer resulterer altid i en tilsvarende ugyldig prøve i Rotor-Gene AssayManager.</p>
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Ugyldig	Bølget baseline for rådatafluorescensen påvises i amplifikationskurven.

- Hvis alle kontrollerne i kørslen er gyldige, analyserer Rotor-Gene AssayManager v1.0 de ukendte prøver. I prøven skal der være en minimal mængde bisulfitkonverteret DNA til

stede, før resultaterne kan fortolkes. Dette angives af C_T -værdien af husholdningsgenet ACTB, som skal være $\leq 26,4$, før en prøve kan godkendes af Rotor-Gene AssayManager.

- $\Delta\Delta C_T$ -værdierne for *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* skal derefter beregnes, og resultatet fremkommer. Hvis en $\Delta\Delta C_T$ -værdi er under cutoff, er målresultatet "Hypermethylation positive" (Positiv for hypermethylering).
- Bemærk: Delvise eller lave niveauer af methylering er et naturligt forekommende fænomen, der modsat hypermethyleringsniveauer ikke er direkte relateret til udviklingen af cancer.
- En prøve anses for at være "Hypermethylation positive" (Positiv for hypermethylering), når mindst ét af målene viser resultatet "Hypermethylation positive" (Positiv for hypermethylering).

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" (Hyppigt stillede spørgsmål) hos vores Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

For fejlfindingsoplysninger i forbindelse med Rotor-Gene AssayManager henvises der til *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Kommentarer og forslag

Generel håndtering

Prøve-DNA-koncentrationen er for lav til bisulfitkonvertering

Kontrollér DNA-ekstraktet

Gentag DNA-ekstraheringen med en mere koncentreret klinisk prøve

Kommentarer og forslag

Prøven er ugyldig: forstærkningen af ACTB er for lav eller fraværende

- | | |
|--|--|
| a) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser | Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionsopsætningen. Gentag PCR-kørslen. |
| b) Kontrollér DNA-koncentratet | Øg DNA-inputtet for bisulfitkonvertering til maksimum. Bisulfitkonverteringsreaktionen har optimal ydeevne for DNA-input fra 100 ng-2 µg |
| c) Kontrollér det bisulfitkonverterede eluat | Gentag bisulfitkonverteringen. Om nødvendigt kan der anvendes et højere DNA-input. |

Prøven er ugyldig: Målene *FAM19A4* og/eller *hsα-mir124-2* er ugyldige

- | | |
|-------------------------|---|
| Utilstrækkelig blanding | Bland prøven og reaktionsblandingen ved at pipettere (ca. 10 gange pr. rør). Gentag prøven. |
|-------------------------|---|

Det positive kontrolresultat er ugyldigt: Amplifikationen er for lav eller fraværende for ét eller flere mål

- | | |
|---|--|
| a) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser | Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionsopsætningen. Gentag PCR-kørslen. |
| b) Delvis forringelse | Opbevar kittets indhold ved -15 til -30 °C. Undgå gentagen indfrysning og optøning til mere end tre cyklusser. |
| c) PCR-reagenserne er delvist forringede | Opbevar kittets indhold ved -15 til -30 °C, og beskyt reaktionsblandingerne mod lys. Undgå gentagen indfrysning og optøning. |
| d) Vending af båndrør | Kontrollér pipetteringsskemaet og reaktionsopsætningen. |
| e) Udløbsdato | Kontrollér udløbsdatoen for det anvendte kit. |
| f) Forsinkelse mellem pipettering af prøver og start af kørslen | PCR-reaktionsblandinger kan opbevares ved 2-8 °C i 30 minutter i mørke mellem dispensering af prøver i PCR-reaktioner og start af kørslen på maskinen. |

Kommentarer og forslag

Ikke-skabelon-kontrollen (NTC) er ugyldig

- | | |
|---|---|
| a) Pipetteringsfejl | Kontrollér pipetteringskemaet og reaktionsopsætningen. Gentag PCR-kørslen. |
| b) Krydskontaminering | Udskift alle kritiske reagenser.
Håndter altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer iht. almindeligt accepterede fremgangsmåder for at forhindre afsmittende kontaminering. |
| c) Reagenskontaminering | Udskift alle kritiske reagenser.
Håndter altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer iht. almindeligt accepterede fremgangsmåder for at forhindre afsmittende kontaminering. |
| d) Vending af båndrør | Kontrollér pipetteringskemaet og reaktionsopsætningen. |
| e) Forsinkelse mellem pipettering af prøver og start af kørslen | PCR-reaktionsblandinger kan opbevares ved 2-8 °C i 30 minutter i mørke mellem dispensering af prøver i PCR-reaktioner og start af kørslen på maskinen. |
| f) Probeforringelse | Beskyt reaktionsblandingerne mod lys.
Kontrollér for falsk-positive resultater på fluorescenskurven. |

Fraværende eller lave signaler i prøven, men kontrollkørslen er ok

- | | |
|----------------------|--|
| a) Hæmmende effekter | Kontrollér altid, at der ikke er rester af buffer på filteret efter centrifugering under bisulfitkonvertering.
Gentag bisulfitkonverteringen. |
| b) Pipetteringsfejl | Kontrollér pipetteringskemaet og reaktionsopsætningen. Gentag PCR-kørslen. |

Hvis problemet fortsætter, skal du kontakte QIAGENs tekniske serviceafdeling.

Begrænsninger

QIASure Methylation-testens reagenser må kun bruges til in vitro-diagnostik.

Brug af PCR-test kræver god laboratoriepraksis, herunder vedligeholdelse af udstyr, som er beregnet til molekylærbiologi og overholder gældende regler og relevante standarder.

Reagenser og instruktioner i dette kit er blevet godkendt til optimal ydeevne.

QIASure Methylation-testen skal anvendes af professionelt laboratoriepersonale, som er uddannet i brugen af Rotor-Gene Q MDx-instrumenter og Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Produktet skal bruges af personale med særlig kompetence og uddannelse alene i teknikkerne i real-time PCR og in vitro-diagnostiske procedurer. De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund.

Brugervejledningen (håndbogen) skal følges fuldstændigt for at opnå optimale PCR-resultater.

Vær opmærksom på de udløbsdatoer, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug ikke komponenter, der er for gamle.

Prøver med lav DNA-kvalitet/-kvantitet (dvs. ACTB C_T -værdier lige inden for godkendelseskriteriet. C_T -værdier fra 25 til 26,4) kan give falsk-negative resultater. Det anbefales at gentage testen enkeltvist. Et negativt resultat for den gentagne test betyder, at prøven er negativ for hypermethylering, og et positivt resultat betyder, at prøven er positiv for hypermethylering.

Alle reagenser, der leveres med QIASure Methylation-testen, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme kit. Ellers kan det påvirke ydeevnen.

QIASure Methylation-testen er godkendt til HPV-positive kvinder.

QIASure Methylation-testen er godkendt til cervikale prøver, som er indsamlet og opbevaret i et PreservCyt- eller STM-indsamlingsmedium, og til selvindsamlede vaginale børsteprøver, som er indsamlet i saltvandsopløsning (0,9 % w/v NaCl). QIASure Methylation-testen er ikke godkendt til brug med cervikale prøver, som er indsamlet og opbevaret i prøveindsamlingsmedier, der indeholder formaldehyd, f.eks. BD® Surepath® eller tilsvarende. Formaldehyd forårsager sammenkædning af DNA, hvilket kan påvirke ydeevnen i QIASure Methylation-testen.

Kun Rotor-Gene Q MDx er blevet godkendt til brug med QIASure Methylation-testens PCR-analyse.

Enhver brug til andre formål end de tiltænkte for dette produkt og/eller komponentændringer gør, at Self-screen B.V.'s garanti bortfalder.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af Self-screens ydelsesundersøgelser.

Ydelsesegenskaber

Påvisningsgrænse (LOD)

Den analytiske sensitivitet i QIASure Methylation-testen blev bestemt som 95 % af påvisningsgrænsen (95 % LOD) ved hjælp af serielle fortyndingsserier af plasmid, der indeholder alle tre amplikonsekvenser (dvs. *ACTB*, *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*; området 750.000 til 0,25 kopier pr. PCR). Påvisningsgrænsen på 95 % for målene blev vurderet som den laveste plasmidfortynding med mindst 35 ud af 36 positive resultater ($C_T < 40$). I alt blev 12 eksperimenter udført af fire forskellige operatører (1 kørsel pr. operatør pr. dag) ved hjælp af tre forskellige lot og tre forskellige RGQ-systemer. Hvert eksperiment inkluderede tredobbelt test af 11 plasmidfortyndinger. Påvisningsgrænsen på 95 % var for alle tre forskellige mål 7,5 kopier pr. PCR.

Linearitet

Lineariteten af QIASure-analysen blev bestemt med dataene fra de 12 eksperimenter, der blev udført for at vurdere påvisningsgrænsen på 95 %. De to mål *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* og reference-ACTB har lineær forstærkning fra 750.000 op til 7,5 kopier pr. PCR.

Præcision

Præcisionen i QIASure Methylation-testen blev bestemt som variabiliteten inden for samme analyse (variabiliteten i flere resultater fra prøver med den samme koncentration inden for ét eksperiment) og den samlede varians i analysen (variabiliteten i flere resultater af analysen, som er genereret af forskellige operatører, på forskellige instrumenter, med forskellige batches og i forskellige laboratorier). Testen blev udført på bisulfitkonverteret DNA fra en HPV-positiv cervikal højrisiko-prøve, som blev testet positiv for hypermethylering med signaler for både *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* svarende til ca. 3 gange LOD-koncentrationen. Testen blev udført med dobbeltbestemmelse i 8 kørsler af fire forskellige operatører (én kørsel pr. operatør pr. dag) ved hjælp af to forskellige lot og tre forskellige RGQ-maskiner i to forskellige laboratorier, hvilket gav 16 datapunkter pr. prøve. Varianskoefficienten (CV) blev bestemt for C_T - og $\Delta\Delta C_T$ -værdier (tabel 3).

Tabel 3. CV % af C_T - og $\Delta\Delta C_T$ -værdierne i en metyleringspositiv cervikal prøve

	Prøvetype	Variabilitet inden for samme analyse	Samlet varians i analysen
C_T-værdi	Intern prøve kvalitetskontrol (dvs. ACTB)	0,3 %	1,32 %
	<i>FAM19A4</i>	1,02 %	1,52 %
	<i>hsa-mir124-2</i>	1,16 %	1,64 %
$\Delta\Delta C_T$-værdi	<i>FAM19A4</i>	3,70 %	5,97 %
	<i>hsa-mir124-2</i>	4,21 %	5,75 %

Den overordnede statistiske spredning i C_T -værdierne for en prøve med den nævnte koncentration er 1,32 % for den interne prøve kvalitetskontrol (ACTB), 1,52 % for *FAM19A4*

og 1,64 % for *hsa-mir124-2*. Den overordnede statistiske spredning i $\Delta\Delta C_T$ -værdierne for en prøve med den nævnte koncentration er 5,97 % for *FAM19A4* og 5,75 % for *hsa-mir124-2*.

Interfererende stoffer

De hæmmende stoffer, som blev valgt for deres potentielle virkning på PCR, var desulfonering og vaskebuffer fra bisulfitkonverteringskittet. Stoffer, der kan have været til stede i den oprindelige prøve, blev ikke testet, da prøve-DNA oprensnes to gange med silicakugler, dvs. DNA-ekstrakt fra den oprindelige prøve og DNA-rensning efter bisulfitkonvertering. Spor efter desulfonering og vaskebuffer viste interferens i PCR'en, hvilket blev påvist af et individuelt testresultat for den interne prøvekvalitetskontrol.

Klinisk ydeevne

HPV-positive cervikale prøver*

Den kliniske ydeevne i QIASure Methylation-testen til cervikal intraepitelial neoplas grad 3 (CIN 3) og cervikal cancer (dvs. CIN 3+) blev vurderet ved at teste 267 HPV-positive cervikale højrisikoprøver[§] fra kvinder (i alderen 18-85 år). Ni prøver (3,4 %) viste ACTB C_T -værdier over 26,4 og var ugyldige. De 258 prøver med gyldige testresultater bestod af 117 cervikale prøver fra kvinder uden tegn på CIN 2 eller værre efter 18 måneders opfølgning (forkortes \leq CIN 1), 42 med CIN 2, 30 med CIN 3, 59 med pladecellekræft og 10 med adenokarcinom. Cervikale prøver blev indsamlet i et PreservCyt-indsamlingsmedium (Hologic). DNA blev ekstraheret fra de cervikale prøver, og 250 ng DNA blev brugt til input i bisulfitkonverteringsreaktionen (EZ DNA Methylation-kit, ZYMO Research). Ud af det 250 ng modificerede DNA blev 20 % brugt i PCR (svarende til 50 ng originalt mål-DNA/PCR). QIASure Methylation-testens positivitetsfrekvenser, som er stratificeret efter det kliniske slutpunkt, er vist nedenfor (tabel 4).

* Lægeindsamlede cervikale prøver.

Table 4. QIASure Methylation-testens positivitetstendenser

Klinisk slutpunkt	Fraktion	Positivitetstendens (95 % CI)
≤ CIN 1	24/117	20,5 % (14,1-28,8)
CIN 2	16/42	38,1 % (24,8-53,4)
CIN 3	20/30	66,7 % (48,4-84,0)
Pladecellekræft	59/59	100,0 % (94,0-100,0)
Adenokarcinom	10/10	100,0 % (69,0-100,0)

Blandt de HPV-positive cervikale højrisikoprøver er sensitiviteten for CIN 3+ 89,9 % (89/99; 95 % CI: 82,2-94,5) og for carcinoma er sensitiviteten 100 % (69/69, 95 % CI: 94-100).*

HPV-positive, selvindsamlede vaginale børsteprøver

Den kliniske ydeevne i QIASure Methylation-testen til selvindsamlede vaginale børsteprøver til påvisning af cervical intraepitelial neoplasi grad 3 og cervical cancer (dvs. CIN 3+) blev vurderet ved test af 247 HPV-positive vaginale højrisikoprøver. For 14 prøver (5,7 %) var ACTB C_T-værdierne > 26,4, og det efterfølgende resultat var ugyldigt. Prøverne med gyldige testresultater bestod af 148 selvindsamlede børsteprøver fra kvinder med ≤ CIN 1 efter 18 måneders opfølgning, 24 med CIN 2, 50 med CIN 3, 8 med pladecellekræft og 3 med adenokarcinom. DNA blev ekstraheret fra de vaginale prøver, og 250 ng DNA blev brugt til input i bisulfidkonverteringsreaktionen (EZ DNA methylation-kit, ZYMO Research). Ud af det 250 ng bisulfidkonverterede DNA blev 20 % brugt i PCR (svarende til 50 ng originalt mål-DNA/PCR). QIASure Methylation-testens positivitetstendenser, som er stratificeret efter det kliniske slutpunkt, er vist nedenfor (tabel 5).

* Bemærk: Hypermetylering af målene i prøver fra kvinder med fremskreden CIN-læsion og/eller cervical cancer kan forblive upåviset på grund af variabilitet i prøvetagningen, f.eks. som et resultat af utilstrækkelig prøvetagning.

Table 5. QIASure Methylation-testens positivitetstendenser

Klinisk slutpunkt	Fraktion	Positivitetstendens (95 % CI)
≤ CIN 1	34/148	23,0 % (16,9-30,4)
CIN 2	7/24	29,2 % (14,6-49,8)
CIN 3	33/50	66,0 % (52,0-77,7)
Pladecellekræft	8/8	100,0 % (63,1-100,0)
Adenokarcinom	3/3	100,0 % (29,2-100,0)

Blandt de HPV-positive selvindsamlede vaginale børsteprøver er sensitiviteten for CIN 3+ 72,1 % (44/61; 95 % CI: 59,7-81,9) og for carcinoma er sensitiviteten 100 % (11/11, 95 % CI: 72-100).*

Ydeevnen i *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* til påvisning af fremskredne transformerende CIN-læsioner

En analyse af promoter-methylering i værtsceller påviser specifikt såkaldte "fremskredne" CIN-læsioner, som indeholder en cancerlignende methyleringsprofil og har en forventet høj kortsigtet risiko for at udvikle sig til cancer (7, 8). Ydeevnen i promoter-hypermethyleringsanalyse af *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* blev vurderet ved at teste 29 HPV-positive højrisikoprøver fra kvinder med fremskreden transformerende CIN 2/3 og 19 HPV-positive højrisikoprøver fra kvinder med tidligt transformerende CIN 2/3. Methylering blev især forbundet med fremskreden sygdom og viste alle fremskredne CIN 2/3-læsioner (100 %: 29/29; 95 % CI: 88-100) positiv for hypermethylering sammenlignet med 47 % (9/19; 95 % CI: 27-69) af tidlige CIN 2/3-læsioner.

Robusthed

Robustheden i QIASure Methylation-testen blev bestemt som overensstemmelse mellem outputtet fra QIASure Methylation-testen og RUO-versionen af analysen. Testen blev udført på bisulfitkonverteret genomisk DNA fra 10 HPV-positive cervikale højrisikoprøver, hvoraf 5 tidligere var identificeret som hypermethyleringsnegative for begge markører og 5 som

* Bemærk: Hypermethylering af målene i prøver fra kvinder med fremskreden CIN-læsion og/eller cervical cancer kan forblive upåvist på grund af variabilitet i prøvetagningen, f.eks. som et resultat af utilstrækkelig prøvetagning.

methyleringspositive (f.eks. for mindst én af de 2 markører). Testen blev udført med dobbeltbestemmelse i 8 kørsler af fire forskellige operatører (én kørsel pr. operatør pr. dag) ved hjælp af to forskellige lot og tre forskellige Rotor-Gene Q MDx-instrumenter udført i to forskellige laboratorier. I alt blev der opnået 16 datapunkter for hver prøve (tabel 6).

Tabel 6. Overensstemmelse mellem QIASure Methylation-testen og RUO-versionen af analysen

Prøvenummer	RUO-resultat	Overensstemmelse mellem Lab 1 og RUO	Overensstemmelse mellem Lab 2 og RUO
1	Neg	100 % (8/8)	100 % (8/8)
2	Neg	100 % (8/8)	100 % (8/8)
3	Neg	62,5 % (5/8)	62,5 % (5/8)
4	Neg	100 % (8/8)	100 % (8/8)
5	Neg	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Subtotal		92,5 % (37/40)	92,5 % (37/40)
6	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
7	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
8	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
9	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
10	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Subtotal		100 % (40/40)	100 % (40/40)
Total (positiv og negativ)		96,25 % (77/80)	96,25 % (77/80)

Fire ud af de fem prøver, som tidligere blev identificeret som methyleringsnegative, viste 100 % overensstemmelse ved brug af QIASure Methylation-testen i begge laboratorier. Prøve 3 viste en overensstemmelse på 62,5 % (5/8) i begge laboratorier. Observeret variation relateret til *FAM19A4* med niveauer omkring analysens cut-off-værdier. Den overordnede overensstemmelse blandt de methyleringsnegative prøver var 92,5 % (37/40).











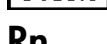





Alle 5 prøver, der tidligere blev identificeret som methyleringspositive, viste 100 % overensstemmelse med referenceanalysen, og derved var den overordnede overensstemmelse 100 % (40/40).

Referencer

1. Costello, J.F., and Plass, C. (2001) Methylation matters. *J. Med. Genet.* **38**, 285–303.
2. Wiling, S.M., et al. (2010) Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of *hsa-mir124* in cervical cancer. *Mol. Cancer* **9**, 167.
3. De Strooper, L.M., et al., (2014) Methylation analysis of the *FAM19A4* gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev. Res.* **7**, 1251–7.
4. De Strooper, L.M., et al. (2014) *CADM1*, *MAL* and *mir124-2* methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J. Clin. Pathol.* **67**, 1067–71.
5. De Strooper, L.M., et al. (2016) Comparing the performance of *FAM19A4* methylation analysis, cytology and HPV 16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in high-risk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). *Int. J. Cancer* **138**, 992–1002.
6. De Strooper, L.M., et al. (2016) Validation of the *FAM19A4/mir124-2* DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol. Oncol.* **141**, 341–7.
7. Bierkens, M. et al. (2013) *CADM1* and *MAL* promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int. J. Cancer* **133**, 1293–9.
8. Steenbergen, R.D.M. et al. (2014) Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 395–405.
9. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *25/402/8*.

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
	Anvendes inden
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	CE-IVD-symbol
	Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> reaktioner
	Katalognummer
	Lot-nummer
	Materialenummer
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
Rn	R står for revision af brugsvejledningen (håndbogen), og n er revisionsnummeret
	Globalt varenummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Beskyttes mod lys
	Se de informationer, der er angivet i håndbogen
	Forsigtig

Kontaktoplysninger

For teknisk bistand og yderligere information henvises til vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, ring på 00800-22-44-6000, eller kontakt en af QIAGENs tekniske serviceafdelinger eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
QIASure Methylation Test Kit	Til 72 reaktioner: 2 masterblandinger, 2 kalibratorer.	616014
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cyklusanordning og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inkluderer 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter; installation og uddannelse	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cyklusanordning og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: Inkluderer 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter. Installation og uddannelse er ikke inkluderet	9002032
Rotor-Gene Q MDx-tilbehør		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 bånd a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner	981103

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 bånd a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
Rotor-Gene AssayManager – til rutinetest med Rotor-Gene Q MDx-instrumenter		
Rotor-Gene AssayManager	Software til rutinetest kombineret med Rotor-Gene Q- og QIA Symphony RGQ-instrumenter; software med enkeltlicens til installation på én computer	9022739

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller -brugermanual. QIAGEN kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGENs tekniske service eller den lokale distributør.

Denne side er tom med vilje.

Denne side er tom med vilje.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *digene*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Gruppen); BD®, SurePath® (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyte® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.). HB-2304-001

Self-screen B.V. er den ansvarlige producent af QIASure Methylation-testen.

QIASure Methylation-testen er produceret af Self-screen B.V. og forhandles af QIAGEN i Europa.

Aftale om begrænset licens til QIASure Methylation-testen

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogen af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

For opdaterede licensbetingelser henvises til www.qiagen.com.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com