

Luglio 2023

QIAsure™ Methylation Test

Istruzioni per l'uso (manuale)



72

Versione 1

Per l'uso con lo strumento Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM



616014

Self-screen B.V., Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam,
Paesi Bassi

1132288IT

Indice

Uso previsto	4
Sommario e spiegazioni	5
Principio della procedura	5
Materiali in dotazione	7
Contenuto del kit	7
Materiale necessario ma non in dotazione	7
Avvertenze e precauzioni	10
Informazioni sulla sicurezza	10
Precauzioni generali	10
Precauzioni per i profili AssayManager	12
Conservazione e manipolazione dei reagenti	13
Conservazione e manipolazione dei campioni	14
Preparazione dei campioni per campioni conservati in PreservCyt	16
Preparazione dei campioni per campioni conservati in SurePath™	19
Raccomandazioni generali per la conversione con bisolfito	20
Protocollo: PCR con QIAsure Methylation Test nello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	21
Interpretazione dei risultati	34
Guida alla risoluzione dei problemi	38
Limitazioni	40
Caratteristiche delle prestazioni	42
Limite di sensibilità (Limit of Detection, LOD)	42

Linearità	42
Precisione.....	42
Sostanze interferenti	43
Prestazioni cliniche	44
Robustezza.....	47
Riferimenti.....	50
Simboli.....	52
Informazioni di contatto.....	53
Informazioni per gli ordini	54
Cronologia delle revisioni del documento	57

Uso previsto

Il QIAsure Methylation Test (n. cat. no. 616014) è un esame per real-time PCR multiplex specifico per la metilazione, che consente di rilevare l'ipermetilazione del promotore dei geni *FAM19A4* e *hsa-mir124-2*. I campioni che possono essere testati con il QIAsure Methylation Test includono il DNA convertito con bisolfito da campioni prelevati nei modi seguenti:

- Campioni cervicali prelevati (da un medico) con il *digene*® HC2 DNA Collection Device
- Campioni cervicali prelevati (da un medico) con un dispositivo di prelievo del tipo a spazzola/spazzolino e collocati in PreservCyt® Solution o in SurePath™ Solution
- Campioni vaginali prelevati (dalla stessa paziente) con un dispositivo del tipo a spazzola/spazzolino

Indicazioni per l'uso

1. Come test di follow-up per le donne con test del papillomavirus umano (HPV) positivo, per determinare la necessità di invio a specialista per colposcopia o altre procedure di follow-up.
2. Come test di follow-up per donne con risultati di Pap Test che mostrano cellule squamose atipiche di significato indeterminato (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), per determinare la necessità di invio a specialista per colposcopia o altre procedure di follow-up.

Questo prodotto è destinato a utenti professionisti, quali tecnici e laboratoristi, esperti nelle procedure diagnostiche in vitro, oltre che nell'uso delle tecniche di biologia molecolare e del Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System.

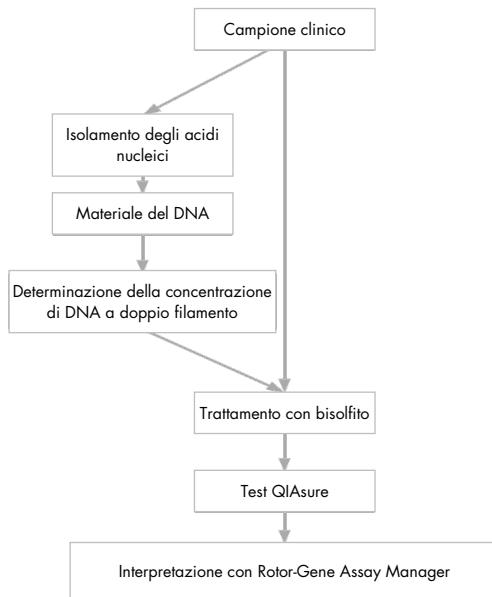
Sommario e spiegazioni

La metilazione del DNA è un processo biochimico importante per il normale sviluppo degli organismi superiori (1). Tale processo prevede l'aggiunta di un gruppo metilico sulla posizione 5 dell'anello pirimidinico del nucleotide citosina. Pattern anomali di metilazione del DNA giocano un ruolo importante anche nella carcinogenesi. In un certo numero di cancri umani e linee cellulari tumorali, tra cui il cancro cervicale e quello endometriale, è stata rilevata un'ipermetilazione del promotore dei geni *FAM19A4* (famiglia con similarità di sequenza 19 (chemochina (motivo C-C)-like) membro A4) e/o *hsa-mir124-2* (*homo sapiens* micro RNA 124-2) (2-6). L'analisi della metilazione del promotore della cellula ospite rileva specificamente i tumori e le cosiddette lesioni da neoplasia intraepiteliale cervicale (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) "avanzate", che presentano un profilo di metilazione di tipo tumorale e un elevato rischio a breve termine di progressione in cancro (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). Attraverso l'uso del gene *ACTB* (gene umano β -actin) come controllo di qualità interno per i campioni, l'esame QIAsure consente di rilevare l'ipermetilazione del promotore dei geni *FAM19A4* e *hsa-mir124-2* nel DNA convertito con bisolfito, isolato da campioni cervicali o vaginali.

Principio della procedura

Il QIAsure Methylation Test è un test real-time PCR multiplex che amplifica le regioni del promotore metilato dei geni oncosoppressori *FAM19A4* e *hsa-mir124-2*, oltre ad amplificare un frammento aspecifico della metilazione di un gene di riferimento. Il kit contiene 2 provette di QIAsure Master Mix e 2 provette di QIAsure Calibrator. La miscela master è destinata all'amplificazione del DNA convertito con bisolfito preparato a partire da campioni clinici. La miscela master contiene i primer e le sonde per i geni target e il gene di riferimento, che funge da controllo di qualità interno del campione. Il calibratore è un plasmide linearizzato contenente le sequenze degli ampliconi di *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* e *ACTB*.

Procedura del flusso di lavoro



L'esame QIAsure viene eseguito sullo strumento Rotor-Gene Q MDx e il software Rotor-Gene AssayManager® esegue automaticamente l'analisi e l'interpretazione dei dati. Il valore C_T (Cycle Threshold, ciclo soglia) rappresenta il numero di cicli di PCR necessari per la rilevazione di un segnale fluorescente al di sopra di un segnale di fondo, che è correlato al numero di molecole target presenti nel campione. L'esame QIAsure calcola il valore ΔC_T come differenza tra il valore C_T del target *FAM19A4* o *hsa-mir124-2* e il valore C_T del riferimento (*ACTB*). Il ΔC_T è un valore quantitativo relativo, che si riferisce al livello di metilazione del promotore del gene *FAM19A4* o *hsa-mir124-2*. Ai fini della normalizzazione, sottraendo il ΔC_T di un campione calibratore dal ΔC_T del target *FAM19A4* o *hsa-mir124-2* si ottiene un valore $\Delta\Delta C_T$ (9). Il calibratore è un campione standardizzato di DNA plasmidico contenente un numero di copie basso e noto dei 3 target (cioè *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* e *ACTB*).

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

QIAxure Methylation Test	72
Numero di catalogo	616014
Numero di reazioni	72
QIAxure Master Mix (2 provette)	Brown color tube (provetta marrone) 630 µL
QIAxure Calibrator (2 provette)	Transparent color tube (provetta trasparente) 25 µL
<i>Istruzioni per l'uso del QIAxure Methylation Test (manuale)</i>	1

Materiale necessario ma non in dotazione

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Materiali di consumo e reagenti per la preparazione dei campioni per i campioni autoprelevati

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Reagenti per la preparazione di campioni conservati in terreno di raccolta SurePath.

- Buffer AL (QIAGEN numero di catalogo: 19075)

Materiali di consumo e reagenti per la conversione con bisolfito

I kit di conversione con bisolfito verificati includono:

- EZ DNA Methylation Kit (ZYMO Research, n. cat. D5001 o n. cat. D5002)
- EZ DNA Methylation-Lighting (ZYMO Research, n. cat. D5030 o n. cat. D5031)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, n. cat. 59720)
- QIAsymphony Bisulfite Kit (QIAGEN n. cat. 931106)

Materiali di consumo per lo strumento Rotor-Gene Q MDx

- Strip tubes and caps, 0,1 mL (provette per strisce e tappi da 0,1 mL; n. cat. 981103)
- Acqua purificata (ad es., acqua per biologia molecolare, distillata o deionizzata)

Strumentazione

- Pipette regolabili* dedicate per PCR (1-10 µL; 10-100 µL)
- Guanti monouso
- Centrifuga da banco* con velocità >10.000 rpm
- Miscelatore vortex*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, n. cat. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, n. cat. ND-3300) o strumento equivalente
- QIAsymphony SP System (n. cat. 9001297) per l'estrazione automatizzata opzionale e/o la conversione con bisolfito

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

Apparecchiatura per la real-time PCR

- Sistema Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (n. cat. 9002033) o strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (n. cat. 9002032)*
- Rotor-Gene AssayManager Core Application versione 1.0.x (dove x è maggiore o uguale a 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in installato, versione 1.0.x (dove x è maggiore o uguale a 1)
- QIAware Assay Profile (dal file AP_QIAware_CervicalScrape_V1_0_Y.iap; dove Y è maggiore o uguale a 1) da applicare al DNA convertito con bisolfito, ottenuto da campioni cervicali prelevati da un medico
- Profilo dell'esame per campioni autoprelevati con tampone a spazzola QIAware (dal file AP_QIAware_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap; dove Y è maggiore o uguale a 0) da applicare al DNA convertito con bisolfito, ottenuto da campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola

* Strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con data di produzione gennaio 2010 o successiva. La data di produzione può essere ricavata dal numero di serie sul retro dello strumento. Il numero di serie è nel formato "mmaannn", dove "mm" indica il mese di produzione in cifre, "aa" indica le ultime due cifre dell'anno di produzione e "nnn" indica l'ID univoco dello strumento.

Avvertenze e precauzioni

Solo per uso diagnostico in vitro.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le relative schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS). Le schede, nel formato PDF pratico e compatto, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e i relativi componenti.

QIASURE MASTER MIX



Contiene: 1,2,4-triazolo: Pericolo! Sospettato di nuocere alla fertilità o al feto. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia.

Precauzioni generali

L'uso dei test PCR deve avvenire nel rispetto delle buone pratiche di laboratorio, inclusa la manutenzione dell'apparecchiatura dedicata alla biologia molecolare e conforme ai regolamenti e agli standard pertinenti.

Prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni:

- Mentre si maneggiano i campioni, indossare guanti di protezione monouso non talcati, camice da laboratorio e una protezione per gli occhi.

- Evitare qualsiasi contaminazione da microbi e nucleasi (DNasi) del campione e del kit. La DNasi può causare la degradazione del template di DNA.
- Evitare la contaminazione da carryover del DNA o del prodotto della PCR, che potrebbe generare un segnale falso positivo.
- Usare sempre puntali per pipette monouso non contaminati da DNasi con barriere anti aerosol.
- I reagenti dell'esame QIAware sono diluiti in modo ottimale. Non diluire ulteriormente i reagenti, in quanto ciò potrebbe provocare una perdita a livello di prestazioni.
- Tutti i reagenti forniti con il kit QIAware sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo kit. Non sostituire alcun reagente di un kit con lo stesso reagente di un altro kit QIAware, anche dello stesso lotto, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni.
- Per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure, consultare il manuale utente dello strumento Rotor-Gene Q MDx.
- Prima del primo processo della giornata, eseguire un processo di riscaldamento per Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM a 95°C per 10 minuti.
- In caso di alterazione dei tempi e delle temperature di incubazione, i dati generati potrebbero essere erronei o discordanti.
- Non utilizzare componenti del kit la cui data di scadenza sia stata superata o che non siano stati correttamente conservati.
- Ridurre al minimo l'esposizione dei componenti alla luce: le miscele di reazione possono essere alterate come conseguenza dell'esposizione.
- Prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione delle miscele con i materiali sintetici contenuti nei reagenti per PCR.
- Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Precauzioni per i profili AssayManager

È necessario utilizzare profili AssayManager diversi a seconda del tipo di campione. Assicurarsi che venga utilizzato il profilo corretto per il tipo di campione da testare, come indicato di seguito:

- “Il profilo dell’esame per lo striscio cervicale QIAsure (dal file AP_QIAsure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)” deve essere utilizzato per l’analisi del DNA convertito con bisolfito ottenuto da campioni cervicali prelevati da un medico
- “Il profilo dell’esame QIAsure per campioni autoprelevati con tampone a spazzola (dal file AP_QIAsure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)” deve essere utilizzato per l’analisi del DNA convertito con bisolfito ottenuto da campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Condizioni per la spedizione

Il QIAsure Methylation Test viene spedito in ghiaccio secco. Qualora uno dei componenti del QIAsure Methylation Test non dovesse essere congelato alla consegna, la confezione esterna dovesse essersi aperta durante il tragitto o la scatola non dovesse contenere la nota di accompagnamento, i manuali o i reagenti, contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Condizioni per la conservazione

Alla consegna riporre immediatamente il QIAsure Methylation Test in un congelatore termoregolato e conservarlo a un temperatura compresa tra -30°C e -15°C al riparo dalla luce.

Stabilità

Se conservato nelle condizioni specificate, il QIAsure Methylation Test è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.

Dopo l'apertura, i reagenti possono essere conservati nella loro confezione originale a un temperatura compresa tra -30°C e -15°C. Evitare di scongelare e congelare ripetutamente. Non superare il numero massimo di 3 cicli di congelamento/decongelamento.

- Miscelare delicatamente il contenuto capovolgendo le provette 10 volte e centrifugandole prima dell'apertura.
- Le date di scadenza dei reagenti sono indicate sull'etichetta dei singoli componenti. Se il prodotto è conservato correttamente, mantiene inalterate le proprie prestazioni per tutto il periodo di stabilità dichiarato, a condizione che i componenti utilizzati appartengano agli stessi lotti.

Conservazione e manipolazione dei campioni

CAUTELA



Tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.

Campioni cervicali

Il kit QIAsure è destinato all'uso con campioni di DNA genomico convertito con bisolfito ottenuti da campioni cervicali. I terreni di raccolta approvati per l'uso con i campioni cervicali (strisci) sono il terreno di raccolta PreservCyt®, il terreno di raccolta SurePath™ e il terreno di trasporto campione (Specimen Transport Medium, STM) Digene. La temperatura ottimale di conservazione dei campioni clinici è di 2-8°C all'arrivo in laboratorio. In queste condizioni di conservazione, i campioni nel terreno di raccolta PreservCyt o SurePath™ sono stabili per 3 mesi prima dell'estrazione del DNA.

Nota: i campioni cervicali in STM possono essere spediti a 2-30°C se la consegna al laboratorio di analisi è prevista entro la mattina successiva e, all'arrivo, devono essere ricongelati a -20°C.

Campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola

Il QIAsure Methylation Test è destinato all'uso con campioni di DNA genomico convertito con bisolfito estratti da campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola. I campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola possono essere raccolti e spediti secchi e all'arrivo al laboratorio conservati in terreno di raccolta PreservCyt con un volume di conservazione consigliato di 2-3 mL. I campioni in terreno di raccolta PreservCyt possono essere conservati a 2-8°C o a temperatura ambiente per non più di 3 mesi.

Campioni di DNA genomico

Dopo l'estrazione del DNA genomico, i campioni possono essere conservati e spediti a temperature comprese tra -30°C e -15°C per non più di 12 mesi.

Preparazione dei campioni per campioni conservati in PreservCyt

Il QIAsure Methylation Test è stato convalidato per l'uso con DNA genomico convertito con bisolfito, derivato da campioni cervicali. La conversione con bisolfito del DNA genomico può essere eseguita:

- i) con precedente estrazione del campione di DNA e controllo di qualità del DNA, o
- ii) direttamente sul campione cervicale utilizzando l'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, n. cat. 59720), o
- iii) direttamente sul campione cervicale utilizzando il QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN, n. cat. 931106).

Di seguito sono riportate le nostre raccomandazioni.

- i) Conversione con bisolfito con precedente estrazione del DNA e controllo di qualità del DNA
Questo protocollo richiede l'estrazione del DNA, la misurazione della concentrazione del DNA, seguita dall'aliquotazione del volume ottimale dell'eluato prima di iniziare con il protocollo di conversione con bisolfito, ed è stato verificato per l'EZ DNA Methylation™ Kit (n. cat. D5001) e EZ DNA Methylation-Lightning Kit (n. cat. D5030) di ZYMO Research. Raccomandiamo i seguenti metodi:
 - Estrazione del DNA
I kit standard per l'estrazione del DNA (ad esempio, i kit basati sulle colonne e sulle biglie magnetiche) sono compatibili con il QIAsure Methylation Test.
 - Misurazione della concentrazione di DNA
Prima della conversione con bisolfito del DNA, misurare la concentrazione di DNA. Vi sono sistemi capaci di misurare le concentrazioni di DNA, come Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (entrambi prodotti da Thermo Fisher Scientific) o sistemi equivalenti.

- Aliquotazione dell'eluato di DNA

Il volume d'ingresso ottimale di DNA per la conversione con bisolfito varia da 100 ng a 2 µg, con 200 ng raccomandati per la conversione con bisolfito. Se la concentrazione di DNA è troppo bassa per la conversione con bisolfito, ripetere l'estrazione del DNA con un volume d'ingresso maggiore del campione clinico o eluire il DNA in un volume di eluizione inferiore.

- La conversione con bisolfito con l'EZ DNA Methylation Kit e l'EZ DNA Methylation-Lightning Kit si esegue secondo le raccomandazioni del produttore.

Nota: secondo l'EZ DNA Methylation Kit, per ottenere un'efficacia di conversione sufficientemente elevata (>98%) la quantità massima di DNA del campione non deve superare i 2 µg.

- ii) conversione con bisolfito direttamente sul campione cervicale con l'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit

La conversione con bisolfito eseguita direttamente su campione cervicale raccolto in soluzione PreservCyt® Solution è stata verificata per l'EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit di QIAGEN. Si fa riferimento al *Manuale EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion* per campioni di DNA ad alta concentrazione (1 ng-2 µg) secondo le raccomandazioni del produttore, ad eccezione dei seguenti punti:

- Passaggio 1 del protocollo. Prelevare il 2,5% del campione cervicale in terreno di raccolta PreservCyt® (cioè 500 µL da 20 mL) e sedimentare mediante centrifugazione per 10 minuti a un minimo di 3390 x g. Eliminare il supernatante lasciando il precipitato cellulare a un massimo di 20 µL di terreno di raccolta PreservCyt. Per la reazione di conversione con bisolfito, utilizzare questo campione di precipitato cellulare e continuare con il passaggio 2 del protocollo del produttore.
- Buffer BL: non aggiungere RNA trasportatore.
- Il volume di eluizione del DNA con conversione con bisolfito è di 50 µL di Buffer EB per ogni campione.

- *iii) Conversione con bisolfito direttamente sul campione cervicale con il QIAsymphony Bisulfite Kit*

La conversione con bisolfito eseguita direttamente su campione cervicale raccolto in soluzione PreservCyt® Solution è stata verificata per il QIAsymphony Bisulfite Kit di QIAGEN. Si fa riferimento al manuale del QIAsymphony Bisulfite Kit e il test viene eseguito secondo le raccomandazioni del produttore.

- Prelevare il 2,5% del campione cervicale in terreno di raccolta PreservCyt® (cioè 500 µL da 20 mL) e sedimentare mediante centrifugazione per 10 minuti a un minimo di 3390 x g. Eliminare il supernatante lasciando il precipitato cellulare a un massimo di 20 µL di terreno di raccolta PreservCyt residuo.
- Per la reazione di conversione con bisolfito, seguire la scheda del protocollo "QIAsymphony SP protocol sheet - Bisulfite 140_HC_V" iniziando al passaggio 2, invece del DNA utilizzare il precipitato cellulare.
- Una volta completata la reazione di conversione con bisolfito, avviare un processo SP su QIAsymphony seguendo i passaggi descritti nel protocollo "Bisulfite conversion of unmethylated Cytosines in different sample types" (Conversione con bisolfito di citosine metilate in diversi tipi di campione) dal manuale del QIAsymphony Bisulfite Kit. L'eluizione avviene in 40 µL.

Preparazione dei campioni per campioni conservati in SurePath™

I campioni conservati in SurePath devono essere pretrattati prima dell'estrazione del DNA. Il QIAsure Methylation Test è stato convalidato per l'uso con DNA genomico convertito con bisolfito, derivato da campioni cervicali secondo la procedura descritta di seguito.

- Prelevare il 2,5% del campione cervicale
- Centrifugare per 10 minuti a 4000 g, rimuovere il supernatante, ma lasciare 100 µL di SurePath™
- Aggiungere 100 µL di Buffer AL e risospendere il precipitato
- Miscelare bene e incubare a 90°C per 20 minuti.
- Raffreddare per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Eseguire l'estrazione del DNA utilizzando QIAamp DNA mini kit (o strumento equivalente) seguendo le istruzioni del produttore, eluire il DNA in 50 µL.
- Misurare la concentrazione di DNA, sistemi adatti sono Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (entrambi prodotti da Thermo Fisher Scientific) o sistemi equivalenti.
- Per la conversione con bisolfito si consigliano 200 ng di DNA; se non sono disponibili 200 ng, utilizzare il volume d'ingresso massimo. Eseguire la conversione con EZ DNA methylation kit o EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo) seguendo le istruzioni del produttore. Utilizzare 2,5 µL di eluito per il QIAsure Methylation Test.

Raccomandazioni generali per la conversione con bisolfito

La reazione di conversione con bisolfito deve essere eseguita in un'area separata designata, da dove viene conservato e dispensato il QIAsure Master Mix, per evitare di contaminare i reagenti.

Il volume d'ingresso da aggiungere nella reazione QIAsure è 2,5 µL di DNA convertito con bisolfito.

Se il controllo qualità interno del campione è negativo (cioè, i valori C_T dell'ACTB sono $>26,4$), la preparazione del DNA convertito con bisolfito del campione ha dato luogo a materiale di quantità e/o qualità insufficiente e viene classificata come non valida. Eseguire i passaggi consigliati per raggiungere un C_T dell'ACTB che rientri nell'intervallo valido per quanto segue:

- Conversione con bisolfito previa estrazione del DNA e controllo della quantità di DNA: Ripetere la reazione di conversione con bisolfito con un maggiore volume d'ingresso di DNA del campione e/o ripetere l'isolamento del DNA con un volume d'ingresso maggiore di campione cervicale
- Conversione con bisolfito direttamente sul campione cervicale: Ripetere la reazione di conversione con bisolfito con il 10%* del campione cervicale in terreno di raccolta PreservCyt (cioè 2 mL da 20 mL).

Il DNA convertito con bisolfito può essere conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8°C fino a 24 ore, tra -25 e -15°C fino a 5 giorni o a temperature inferiori a -70°C fino a 3 mesi. Evitare sempre di congelare e scongelare ripetutamente il DNA convertito con bisolfito. Per mantenere una qualità sufficiente, non superare il numero massimo di 3 cicli di congelamento/scongelamento.

* Il volume del campione per la conversione diretta con bisolfito può essere aumentato quando il tasso di successo è insoddisfacente a causa della variabilità del campionamento, ad esempio a causa di un campionamento inadeguato.

Protocollo: PCR con QIAsure Methylation Test nello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*

Punti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare il protocollo, acquisire esperienza con l'uso dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Vedere il manuale utente dello strumento (n. cat. 9002033 o 9002032).
- Prima del primo processo della giornata, eseguire un processo di riscaldamento per Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM a 95°C per 10 minuti.
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 consente l'interpretazione automatizzata dei risultati della PCR. QIAsure Kit deve essere utilizzato sullo strumento Rotor-Gene Q MDx con il software Rotor-Gene AssayManager v1.0. Acquisire esperienza con l'uso del software Rotor-Gene AssayManager v1.0 (n. cat. 9022739) e del'Epsilon Plug-In consultando i rispettivi manuali utente.
- È necessario utilizzare profili dell'esame diversi di Rotor-Gene AssayManager v1.0 a seconda del tipo di campione. Assicurarsi che venga utilizzato il profilo corretto per il tipo di campione da testare, come indicato di seguito:
 - “Il profilo dell'esame per lo striscio cervicale QIAsure (dal file AP_QIAsure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)” deve essere utilizzato per l'analisi del DNA convertito con bisolfito ottenuto da campioni cervicali prelevati da un medico
 - “Il profilo dell'esame QIAsure per campioni autoprelevati con tampone a spazzola (dal file AP_QIAsure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)” deve essere utilizzato per l'analisi del DNA convertito con bisolfito ottenuto da campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola.

* Strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con data di produzione gennaio 2010 o successiva. La data di produzione può essere ricavata dal numero di serie sul retro dello strumento. Il numero di serie è nel formato “mmaannn”, dove “mm” indica il mese di produzione in cifre, “aa” indica le ultime due cifre dell'anno di produzione e “nnn” indica l'ID univoco dello strumento.

Nota: può essere testato un solo tipo di campione per esperimento. I singoli profili dell'esame sono stati ottimizzati per ogni tipo di campione ed è essenziale che i clienti scelgano il profilo di dosaggio corretto per ottenere risultati ottimali per ogni tipo di campione specifico.

Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Il software Rotor-Gene AssayManager versione v1.0.x (dove x è maggiore o uguale a 4) deve essere installato sul computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx. Per informazioni sull'installazione dell'applicazione core del Rotor-Gene AssayManager v1.0, consultare il *Manuale utente dell'applicazione core del Rotor-Gene AssayManager v1.0*.
- Per il QIAsure Methylation Test è richiesto un plug-in specifico, denominato "Epsilon Plug-in" (versione 1.0.1 o successiva). Questo plug-in può essere scaricato dalla pagina web di QIAGEN: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Il plug-in deve essere installato su un computer che esegua già il software Rotor-Gene AssayManager versione 1.0.x (dove x è maggiore o uguale a 4).
- Il QIAsure Methylation Test richiede un profilo specifico di dosaggio da eseguire con il software Rotor-Gene AssayManager v1.0. Questo profilo dell'esame contiene tutti i parametri necessari per i cicli e l'analisi dell'esperimento. Ci sono 2 QIAsure Assay Profiles:
 - Il profilo dell'esame "QIAsure cervical scrapes" (Striscio cervicale QIAsure) (dal file AP_QIAsure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) corrisponde a campioni cervicali prelevati dal medico
 - Il profilo dell'esame "QIAsure self-collected brush specimens" [Campioni autoprelevati con tampone a spazzola QIAsure (dal file AP_QIAsure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)] corrisponde a campioni autoprelevati con tampone a spazzola. I profili sono disponibili per il download dalla pagina web del QIAsure Methylation Test: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Il profilo dell'esame deve essere importato nel software Rotor-Gene AssayManager.

Nota: il kit QIAware può essere utilizzato solo con determinate impostazioni di configurazione del software Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Ai fini della sicurezza dell'intero sistema, è necessario che le impostazioni di configurazione seguenti siano in modalità chiusa:

- “Material number required” (Numero del materiale obbligatorio)
- “Valid expiry date required” (Data di scadenza valida obbligatoria)
- “Lot number required” (Numero di lotto obbligatorio)

Installazione dell'Epsilon Plug-in e importazione del profilo dell'esame

L'installazione e l'importazione dell'Epsilon Plug-in e del profilo dell'esame sono illustrate dettagliatamente nel *Manuale utente del Rotor-Gene AssayManager Core Application* e nel *Manuale utente dell'Epsilon Plug-in*.

- Scaricare il plug-in Epsilon e la versione più aggiornata di QIAware Assay Profile dal sito web QIAGEN.
- Avviare l'installazione facendo doppio clic sul file EpsilonPlugin.Installation.msi e seguire le istruzioni visualizzate. Per una descrizione dettagliata di questa procedura, consultare la sezione “Installing Plug-ins” (Installazione dei plug-in) nel *Manuale utente dell'applicazione core dell'AssayManager*.

Nota: per impostare la sicurezza a livello di sistema, selezionare la scheda **Settings** (Impostazioni) e attivare le caselle **Material number required** (Numero del materiale obbligatorio), **Valid expiry date required** (Data di scadenza valida obbligatoria) e **Lot number required** (Numero di lotto obbligatorio) per la modalità **Closed** (Chiusa), sezione **Work list** (Elenco di lavoro). Se le caselle non sono già attivate (spuntate), fare clic per attivarle.

- Dopo avere installato correttamente il plug-in, un utente con privilegi amministrativi per il software Rotor-Gene AssayManager dovrà importare il profilo dell'esame dell'AP_QIAware_V1_0_Y.iap con la procedura seguente.



1. Aprire il software Rotor-Gene AssayManager facendo clic sull'icona. Si apre la finestra di Rotor-Gene AssayManager (vedere Figura 1).

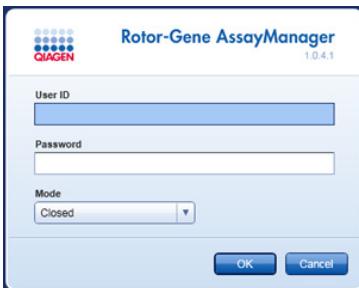
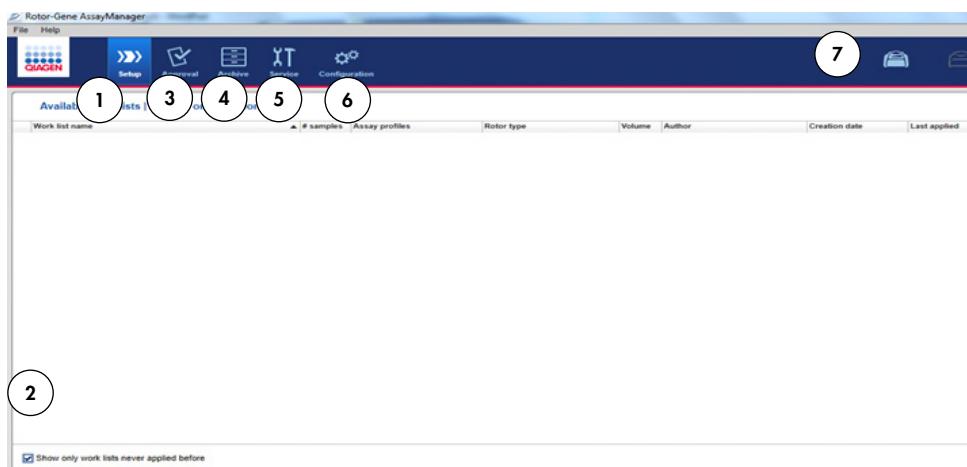


Figura 1. Schermata di login di Rotor-Gene AssayManager.

2. Effettuare il login a Rotor-Gene AssayManager con il proprio ID e la propria password. Non modificare la modalità "Closed" (Chiusa). Fare clic su OK. Si apre la schermata Rotor-Gene Assay Manager (vedere sotto).



- 1 Scheda Set-up (Impostazione). Questa scheda consente di gestire o applicare elenchi di lavoro.
- 2 Il controllo degli elenchi di lavoro applicati mostra solo i nuovi elenchi di lavoro.
- 3 Scheda Approval (Convalida). Questa scheda consente di trovare esperimenti (sedute) precedenti.
- 4 Scheda Archive (Archivio). Consente di trovare esperimenti (sedute) passati che sono già stati approvati.
- 5 Scheda Service (Assistenza). Mostra un report della registrazione delle operazioni effettuate per ogni file generato dal software.
- 6 Scheda Configuration (Configurazione). Consente la configurazione di tutti i parametri software.
- 7 Icone di Rotor-Gene Q MDx.



7. Dopo che il profilo dell'esame è stato importato correttamente, potrà essere utilizzato nell'ambiente di Setup (Impostazione).

Nota: non è possibile importare due volte la stessa versione del profilo dell'esame.

Trattamento dei campioni sugli strumenti Rotor-Gene Q MDx con rotore da 72 provette

È possibile analizzare fino a 70 campioni di DNA convertito con bisolfito nell'ambito della stessa seduta (esperimento), più un calibratore e un controllo senza template (No Template Control, NTC). Lo schema nella Tabella 1 fornisce un esempio di impostazione del blocco di caricamento o del rotore per una seduta con QIAsure Methylation Test. I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore.

Tabella 1. Configurazione del rotore e della piastra per una seduta con il kit QIAsure sullo strumento Rotor-Gene Q MDx

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

CAUTELA



Le provette devono essere inserite nel rotore nel modo indicato nella Tabella 1. L'analisi automatizzata impostata nel profilo dell'esame si basa su questa organizzazione. Se si usa uno schema diverso, si otterranno risultati anomali.

Nota: occupare tutte le posizioni con provette non utilizzate.

PCR su strumenti Rotor-Gene Q MDx dotati di rotore da 72 provette

Prima del primo processo della giornata, eseguire un processo di riscaldamento per Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM a 95°C per 10 minuti.

1. Creare un elenco di lavoro per i campioni da analizzare, seguendo la procedura descritta:
 - 1a. Accendere lo strumento Rotor-Gene Q MDx.
 - 1b. Aprire il software Rotor-Gene AssayManager ed eseguire il login come utente con ruolo di operatore, nella modalità Closed (Chiusa).
 - 1c. Fare clic su New work list (Nuovo elenco di lavoro) nella schermata degli elenchi di lavoro (ambiente "Setup" (Impostazione)).
 - 1d. Selezionare il QIAware assay profile (profilo dell'esame QIAware) dall'elenco dei profili di dosaggio disponibili.

Nota: il profilo dell'esame di AP_QIAware_CervicalScrape_V1_0_Y.iap corrisponde a campioni cervicali; il profilo di dosaggio di AP_QIAware_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap corrisponde a campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola.

Nota: Può essere testato un solo tipo di campione per esperimento.

- 1e. Fare clic su Move (Sposta) per trasferire il profilo di dosaggio selezionato nell'elenco Selected assay profiles (Profili dell'esame selezionati). A questo punto il profilo dell'esame dovrebbe essere visualizzato nell'elenco "Selected assay profiles" (Profili dell'esame selezionati).
- 1f. Specificare il numero di campioni da analizzare nel campo corrispondente.
- 1g. Specificare le seguenti informazioni sul kit QIAware, reperibili sul coperchio della confezione:
 - Numero di materiale: 1102417
 - Data di scadenza valida nel formato AAAA-MM-GG
 - Numero di lotto

- 1h. Selezionare il passaggio Samples (Campioni). Un elenco con i dettagli dei campioni verrà visualizzato nella schermata AssayManager. L'elenco rappresenta la disposizione prevista del rotore.
- 1i. In questo elenco inserire i numeri di identificazione dei campioni ed eventuali informazioni opzionali e commenti su ciascun campione.
- 1j. Selezionare il passaggio Properties (Proprietà) e inserire un nome per l'elenco di lavoro (Figura 2).

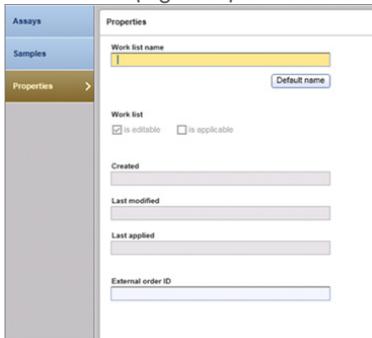


Figura 2. Proprietà

- 1k. Spuntare la casella di controllo is applicable (è applicabile) e fare clic su Apply (Applica).
- 1l. Salvare l'elenco di lavoro.
È possibile stampare l'elenco di lavoro per poterlo consultare in seguito, durante la preparazione e l'allestimento della PCR. Per stampare l'elenco di lavoro, fare clic su Print work list (Stampa elenco di lavoro). I dettagli sui campioni sono inclusi in questo elenco di lavoro.

Nota: è possibile creare l'elenco di lavoro dopo l'impostazione della seduta sullo strumento, oppure salvare l'elenco di lavoro prima di aggiungere i campioni nello strumento.

2. Impostare la seduta QIAware.

Per ridurre al minimo il rischio di contaminazione della reazione PCR, è fortemente consigliato l'uso di una cappa di laboratorio a ultravioletti.

La dispensazione della QIAsure Master Mix deve essere eseguita in un'area separata da quella in cui viene eseguita la reazione di conversione con bisolfito del DNA.

Prima dell'uso, pulire l'area del banco, le pipette e il rack per provette con una soluzione degradante del DNA per prevenire la contaminazione con templato o nucleasi.

Nota: sostituire i puntali tra una provetta e l'altra per evitare qualsiasi contaminazione non specifica del templato o della miscela di reazione che potrebbe portare a risultati falsi positivi.

2a. Scongelare completamente la QIAsure Master Mix e il QIAsure Calibrator, e proteggere il più possibile la QIAsure Master Mix dalla luce.

Nota: per evitare che il materiale si degradi, la fase di scongelamento non deve durare più di 30 minuti.

2b. Miscelare delicatamente capovolgendo 10 volte, quindi centrifugare brevemente prima dell'uso.

2c. Dispensare 17,5 μ L di QIAsure Master Mix pronta all'uso nelle strisce di provette appropriate. La reazione può essere preparata a temperatura ambiente.

2d. Riportare la QIAsure Master Mix nel congelatore per evitare la degradazione del materiale.

2e. Trasportare le provette in un'area separata per dispensare i controlli dell'esame e i campioni convertiti con bisolfito.

2f. Aggiungere 2,5 μ L di acqua al controllo no template (No Template Control, NTC) nella posizione 2 (vedere la Tabella 1 sopra). Miscelare delicatamente pipettando su e giù.

2g. Aggiungere 2,5 μ L di QIAsure Calibrator nella posizione 1 (vedere la Tabella 1 sopra). Miscelare delicatamente, pipettando su e giù, e chiudere la provetta con un tappo.

2h. Aggiungere 2,5 μ L di DNA convertito con bisolfito nella provetta corrispondente. Miscelare delicatamente pipettando su e giù.

2i. Una volta riempito un set di 4 provette, tapparle.

Nota: possono trascorrere al massimo 30 minuti tra il pipettamento dei campioni nelle provette per PCR e l'avvio dell'esperimento sullo strumento, a 2-8°C al buio.

- 2j. Riportare il QIAsure Calibrator nel congelatore per evitare la degradazione del materiale.

Nota: sostituire i puntali tra una provetta e l'altra per evitare qualsiasi contaminazione non specifica del templato o della miscela di reazione, che potrebbe portare a risultati falsi positivi.

3. Preparare il Rotor-Gene Q MDx e avviare la seduta (esperimento) nel modo seguente:
- 3a. Posizionare un rotore da 72 pozzetti sull'apposito supporto per rotori.
 - 3b. Riempire il rotore con le strisce di provette rispettando le posizioni assegnate nella Tabella 1, partendo dalla posizione 1 e inserendo delle provette vuote tappate nelle posizioni inutilizzate.
- Nota: assicurarsi che la prima provetta sia inserita nella posizione 1 e che le strisce di provette siano posizionate con l'orientamento corretto, come illustrato nella Tabella 1.
- 3c. Fissare l'anello di bloccaggio.
 - 3d. Caricare il rotore e l'anello di bloccaggio sullo strumento Rotor-Gene Q MDx, quindi chiudere il coperchio dello strumento.
 - 3e. Nel software Rotor-Gene AssayManager v1.0, selezionare l'elenco di lavoro corrispondente dalla schermata degli elenchi di lavoro, quindi fare clic su **Apply (Applica)** o, se l'elenco di lavoro è ancora aperto, fare clic su **Apply (Applica)**.
- Nota: se l'elenco di lavoro per la sessione non è stato creato, effettuare il login a Rotor-Gene AssayManager v1.0 ed seguire il passaggio 1 prima di procedere.
- 3f. Inserire il nome della seduta (esperimento).
 - 3g. Selezionare il termociclato da utilizzare nell'elenco Cycler selection (Selezione del termociclato).
 - 3h. Verificare che l'anello di bloccaggio sia collegato correttamente e confermare selezionando la casella di controllo corrispondente nella schermata.
 - 3i. Fare clic su **Start experiment (Avvia esperimento)**.
Dovrebbe iniziare la seduta di QIAsure Methylation Test.
4. Al termine della seduta fare clic su **Finish run (Termina seduta)**.

5. Rilasciare e convalidare la seduta.

- Gli utenti che hanno eseguito il login con il ruolo di Approver (Convalidatore) dovranno fare clic su Release and go to approval (Rilascia e vai alla convalida).
- Gli utenti che hanno eseguito il login con il ruolo di Operator (Operatore) dovranno fare clic su Release (Rilascia).

6. Rilascio dei risultati.

- Se si è fatto clic su Release and go to approval (Rilascia e vai alla convalida), vengono visualizzati i risultati dell'esperimento.
- Se ha fatto clic su Release (Rilascia) un utente con il ruolo di utente, un altro utente con il ruolo di "Approver" (Convalidatore) dovrà eseguire il login e selezionare l'ambiente "Approval" (Convalida).
- Filtrare l'esame da approvare selezionando le opzioni del filtro e facendo clic su Apply (Applica).
- Esaminare i risultati e approvare quelli di ciascun campione di test.

Scorrere la tabella "Results" (Risultati) fino al campione da approvare. Ogni risultato di campione da approvare ha altri tre pulsanti di opzione all'estremità della riga dedicata. È possibile selezionare accept (accetta) o reject (rifiuta) per accettare o rifiutare il risultato di un campione.

Nota: un risultato impostato automaticamente su INVALID (Non valido) dal Rotor-Gene AssayManager non può essere più convertito in un risultato valido neanche rifiutando il risultato.

Opzionale: inserire un commento nella colonna Sample comment (Commento sul campione).

- Fare clic su Release/Report data (Rilascio/report dei dati).
- Fare clic su OK. Verrà generato un report in formato PDF (Adobe Portable Document), salvato automaticamente nella cartella predefinita. Il percorso predefinito è: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Nota: è possibile modificare sia il percorso che la cartella predefinita nell'ambiente "Configuration" (Configurazione).

- Passare alla scheda Archive (Archivio) per esportare il file in formato .rex, corrispondente ai dati non elaborati. Trovare il proprio esperimento utilizzando le opzioni di filtro e fare clic su show assays (mostra esami). Quindi, fare clic su Export .rex file (Esporta file .rex) e salvarlo facendo clic su OK. Il software salva automaticamente il file .rex nella seguente cartella predefinita: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**

Nota: il percorso e la cartella possono essere modificati nella scheda **Specify the .rex file export destination** (Specifica destinazione di esportazione del file .rex).

Nota: per eseguire gli interventi di risoluzione dei problemi, è necessario disporre di un pacchetto di supporto creato dal processo. I pacchetti di supporto possono essere generati nell'ambiente "Approval" (Convalida) o "Archive" (Archivio). Vedere il *Manuale utente del Rotor-Gene AssayManager Core Application*, Risoluzione dei problemi, "Creazione di un pacchetto di supporto" in <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Inoltre potrebbe essere d'aiuto la registrazione delle operazioni effettuate al momento dell'evento ± 1 giorno. Le registrazioni delle operazioni effettuate possono essere recuperate dall'ambiente Service (Assistenza) (*Manuale utente del Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Scaricare lo strumento Rotor-Gene Q MDx e smaltire le strisce di provette nel rispetto dei regolamenti locali sulla sicurezza.

Interpretazione dei risultati

L'analisi è totalmente automatizzata.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analizza per prime le curve di amplificazione e potrebbe quindi invalidare quelle non conformi per forma e ampiezza del rumore. In tal caso verrà associato un avviso (flag) alla curva invalidata (vedere la Tabella 2).

Il software Rotor-Gene AssayManager v1.0 analizzerà quindi i controlli della seduta:

- Calibratore
- NTC

Nota: nel report generato al termine della seduta, i risultati ottenuti con i controlli eseguiti sono visualizzati con gli avvisi (flag) invalidanti davanti ai dati non validi.

Se tutti i controlli della seduta sono conformi, il Rotor-Gene AssayManager procede con l'analisi dei campioni sconosciuti.

La Tabella 2 mostra gli avvisi (flag) di campioni non validi che possono essere assegnati a una singola provetta durante l'analisi da parte del Rotor-Gene AssayManager v1.0, insieme alla spiegazione del significato di ogni flag.

Tabella 2. Avvisi di non validità dei campioni e descrizione delle condizioni

Errore	Comportamento	Descrizione
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Non valido)	Il valore del target è superiore all'intervallo definito. Può trattarsi di un valore C_T , della fluorescenza terminale, della concentrazione o di un valore calcolato, ad esempio il C_T o il ΔC_T medio.
ASSAY_INVALID (ESAME_NON_VALIDO)	Invalid (Non valido)	L'esame non è valido perché almeno un controllo esterno non è valido.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Non valido)	Il valore del target è inferiore all'intervallo definito. Può trattarsi di un valore C_T , della fluorescenza terminale, della concentrazione o di un valore calcolato, ad esempio il C_T o il ΔC_T medio.
CONSECUTIVE_FAULT (ERRORE_CONSECUITIVO)	Invalid (Non valido)	Un target utilizzato per il calcolo di questo target non è valido.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (ANOMALIA_FORMA_CURVA)	Invalid (Non valido)	La curva di amplificazione dei dati grezzi ha una forma che devia dal comportamento previsto per questo esame. Esiste una probabilità elevata che i risultati non siano corretti o che vengano interpretati erroneamente.
FLAT_BUMP (PANCIA_PIATTA)	Invalid (Non valido)	La curva di amplificazione dei dati grezzi ha una forma a pancia piatta che si discosta dal comportamento previsto per questo esame. Esiste una probabilità elevata che i risultati non siano corretti o che vengano interpretati erroneamente (ad es., errata determinazione del valore CT).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Valido)	NTC mostra valori C_T del segnale superiori a 36 per l'ACTB target.
INVALID_CALCULATION (CALCOLO_NON_VALIDO)	Invalid (Non valido)	Il calcolo per questo target non è riuscito.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (ATTRAVERSAMENTO_SOGGLA_MULTIPIO)	Invalid (Non valido)	La curva di amplificazione attraversa la soglia più di una volta. Non è possibile determinare un valore C_T non ambiguo.
NO_BASELINE (NO_LINEA_BASE)	Invalid (Non valido)	Non è stato trovato alcun valore iniziale per la linea di base iniziale.
NO_CT_DETECTED	Variabile	Non viene rilevato alcun valore C_T per questo target.
NO_VALUE	Invalid (Non valido)	Il target non presenta alcun valore, ma è previsto che lo abbia. Questo valore non deve essere compreso in un determinato intervallo. Può trattarsi di un valore C_T , della fluorescenza terminale, della concentrazione o di un valore calcolato (ad esempio il C_T o il ΔC_T medio).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Avvertenza	Deviazione durante la procedura di normalizzazione. La curva di amplificazione è visualizzata con una normalizzazione predefinita; la correttezza dei risultati deve essere controllata manualmente.

Tabella 2. Avvisi di non validità dei campioni e descrizione delle condizioni

OTHER_TARGET_INVALID (ALTRO_TARGET_NON_VALIDO)	Invalid (Non valido)	Un altro target per lo stesso campione non è valido.
SATURATION (SATURAZIONE)	Invalid (Non valido)	La fluorescenza dei dati grezzi è fortemente saturante prima del punto di flesso della curva di amplificazione.
SATURATION_IN_PLATEAU	Avvertenza	La fluorescenza dei dati non elaborati risulta satura nella fase di plateau della curva di amplificazione.
SPIKE (PICCO)	Avvertenza	È stato rilevato un picco nella fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione, ma esternamente alla regione in cui viene determinato il valore C_T .
SPIKE_CLOSE_TO_CT (PICCO_VICINO_A_CT)	Invalid (Non valido)	È stato rilevato un picco nella curva di amplificazione vicino al valore di C_T .
STEEP_BASELINE (IMPENNATA_LINEA_BASE)	Invalid (Non valido)	È stata rilevata una forte impennata della linea di base per la fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione.
STRONG_BASELINE_DIP (CROLLO_LINEA_BASE)	Invalid (Non valido)	È stato rilevato un forte crollo della linea di base per la fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione.
STRONG_NOISE (RUMORE_FORTE)	Invalid (Non valido)	Rilevato un forte rumore al di fuori della fase di crescita della curva di amplificazione.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (RUMORE_FORTE_IN_FASE_CRESCITA)	Invalid (Non valido)	È stato rilevato un forte rumore nella fase di crescita (esponenziale) della curva di amplificazione.
UNCERTAIN	Variabile	I risultati ottenuti dalla scansione automatica dei dati (Automatic Data Scan, AUDAS) configgono con i risultati ottenuti dall'analisi principale. Non è possibile una valutazione automatica univoca della validità dei dati.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variabile	Per un target è stato rilevato un valore C_T che non dovrebbe essere amplificato.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Non valido)	Il target presenta un valore, ma non si tratta di un valore previsto. Può trattarsi di un valore C_T della fluorescenza terminale, della concentrazione o di un valore calcolato, ad esempio il C_T o il ΔC_T medio.
UPSTREAM	Variabile	Lo stato del campione è stato impostato su Invalid (Non valido) o Unclear (Ambiguo) da un processo a monte (upstream) (ad esempio QIAsymphony). Nota: per quanto riguarda i campioni classificati come ambigui, è possibile configurare il comportamento di Rotor-Gene AssayManager nell'ambiente "Configuration" (Configurazione) del software AssayManager. I flag "Invalid" (Non valido) di processi a monte hanno sempre come risultato un campione corrispondente non valido nel Rotor-Gene AssayManager.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (FLUORESCENZA_BASE_ONDULATA)	Invalid (Non valido)	È stata rilevata una linea di base ondulata per la fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione.

- Se tutti i controlli della seduta sono validi, il Rotor-Gene AssayManager v1.0 procede con l'analisi dei campioni sconosciuti. Per poter interpretare i risultati, nel campione deve essere presente una quantità minima di DNA convertito con bisolfito. L'indicatore è il valore C_T del gene costitutivo ACTB, che deve essere $\leq 26,4$, altrimenti Rotor-Gene AssayManager non validerà il campione.
- Verranno quindi calcolati i valori $\Delta\Delta C_T$ per *FAM19A4* e *hsa-mir124-2* e verrà riportato il risultato. Se un valore $\Delta\Delta C_T$ è inferiore al limite di cut-off, il target sarà classificato come "Hypermethylation positive" (Positivo all'ipermetilazione).
Nota: livelli parziali o bassi di metilazione sono un fenomeno naturale che, a differenza dei livelli di ipermetilazione, non sono direttamente correlati allo sviluppo del cancro.
- Un campione è considerato "Hypermethylation positive" (Positivo all'ipermetilazione) quando almeno uno dei bersagli è segnato come "Hypermethylation positive" (Positivo all'ipermetilazione).
- I campioni con DNA di scarsa qualità/quantità (ad esempio, valori C_T di ACTB che rientrano appena nei criteri di ammissibilità; valori C_T compresi tra 25 e 26,4) potrebbero essere considerati falsi-negativi. È consigliabile la ripetizione del test PCR in singolo. Un risultato negativo per il test ripetuto indica che il campione è negativo all'ipermetilazione, un risultato positivo indica che il campione è positivo all'ipermetilazione.
- I campioni con elevata cellularità trattati con un protocollo di conversione diretta rischiano di sovraccaricare la reazione PCR con il DNA, il che può portare a un risultato falso negativo per il target *FAM19A4*. Pertanto, per i campioni con 1) un risultato di ipermetilazione negativo, 2) un valore C_T ACTB ≤ 23 e 3) un valore $\Delta\Delta C_T$ *FAM19A4* compreso tra 10,36 e 11,36, si consiglia di ripetere la PCR con un input di DNA convertito 5 volte inferiore, diluendo il campione in acqua.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante le informazioni e i protocolli descritti in questo manuale o le tecnologie relative a campioni ed esami (per le informazioni sui contatti, vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi relativi a Rotor-Gene AssayManager, fare riferimento al *Manuale utente del Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Commenti e suggerimenti

Manipolazione in genere

Concentrazione di DNA del campione troppo bassa per la conversione con bisolfito

Controllare l'estratto di DNA

Ripetere l'estrazione del DNA con un campione clinico più concentrato

Il campione è considerato non valido: l'amplificazione dell'ACTB è troppo bassa o assente

a) Errore di pipettatura o reagenti mancanti

Controllare lo schema di pipettamento e l'allestimento della reazione. Ripetere la PCR.

b) Controllare il concentrato di DNA

Aumentare al massimo il volume d'ingresso del DNA per la conversione con bisolfito. La reazione di conversione con bisolfito ha prestazioni ottimali per un volume d'ingresso del DNA che varia da 100 ng a 2 µg

c) Per il protocollo "Bisulfite-conversion directly on cervical specimen" (Conversione con bisolfito direttamente su campione cervicale), verificare la cellularità del campione clinico

Ripetere la reazione di conversione con bisolfito con il 10% del campione cervicale nel terreno di raccolta PreservCyt (cioè 2 mL da 20 mL).

d) Controllare l'eluito convertito con bisolfito

Ripetere la conversione con bisolfito, quando necessario si può utilizzare un volume d'ingresso di DNA più elevato.

Il campione è considerato non valido: i target FAM19A4 e/o hsa-mir124-2 non sono validi

Miscelazione insufficiente

Miscelare il campione e la miscela di reazione mediante pipettaggio (circa 10 volte per provetta). Ripetere il test del campione.

Commenti e suggerimenti

Il controllo positivo è considerato non valido: l'amplificazione di uno o più target è troppo bassa o assente

- a) Errore di pipettatura o reagenti mancanti
Controllare lo schema di pipettamento e l'allestimento della reazione.
Ripetere la PCR.
- b) Degradazione parziale
Conservare il contenuto del kit a una temperatura compresa tra -30 e -15°C.
Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, limitandoli a non più di 3 cicli.
- c) Reagenti per PCR parzialmente degradati
Conservare il contenuto del kit tra -30 e -15°C e proteggere le miscele di reazione dalla luce.
Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.
- d) Inversione delle provette sulle strisce
Controllare lo schema di pipettamento e l'allestimento della reazione.
- e) Data di scadenza
Controlla la data di scadenza del kit usato.
- f) Tempo di attesa tra il pipettamento dei campioni e l'inizio della seduta
Le miscele di reazione PCR possono essere conservate a 2-8°C per 30 minuti al buio tra il momento in cui le reazioni PCR vengono aliquotate e l'inizio della seduta sullo strumento.

Il controllo senza template (No template control, NTC) non è valido

- a) Errore di pipettamento
Controllare lo schema di pipettamento e l'allestimento della reazione.
Ripetere la PCR.
- b) Contaminazione crociata
Sostituire tutti i reagenti critici.
Manipolare sempre i campioni, i componenti del kit e i materiali di consumo rispettando le pratiche comunemente approvate per la prevenzione del carryover.
- c) Contaminazione dei reagenti
Sostituire tutti i reagenti critici.
Manipolare sempre i campioni, i componenti del kit e i materiali di consumo rispettando le pratiche comunemente approvate per la prevenzione del carryover.
- d) Inversione delle provette sulle strisce
Controllare lo schema di pipettamento e l'allestimento della reazione.
- e) Tempo di attesa tra il pipettamento dei campioni e l'inizio della seduta
Le miscele di reazione PCR possono essere conservate a 2-8°C per 30 minuti al buio tra il momento in cui le reazioni PCR vengono aliquotate e l'inizio della seduta sullo strumento.
- f) Degradazione della sonda
Conservare le miscele di reazione al riparo dalla luce.
Controllare la presenza di falsi positivi sulla curva di fluorescenza.

Segnali assenti o bassi nel campione, ma seduta di controllo corretta

- a) Effetti inibitori
Controllare sempre che non vi siano resti di tampone sul filtro dopo la centrifugazione durante la conversione con bisolfito.
Ripetere la conversione con bisolfito.
- b) Errore di pipettamento
Controllare lo schema di pipettamento e l'allestimento della reazione.
Ripetere la PCR.

Se il problema persiste, contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN.

Limitazioni

I reagenti del QIAsure Methylation Test possono essere utilizzati esclusivamente per scopi di diagnostica in vitro.

L'uso dei test PCR deve avvenire nel rispetto delle buone pratiche di laboratorio, inclusa la manutenzione dell'apparecchiatura dedicata alla biologia molecolare e conforme ai regolamenti e agli standard pertinenti.

Le istruzioni e i reagenti forniti nel kit sono stati verificati e approvati per garantire prestazioni ottimali.

Il QIAsure Methylation Test deve essere utilizzato da tecnici di laboratorio qualificati, con dimestichezza nell'uso degli strumenti Rotor-Gene Q MDx e del software Rotor-Gene AssayManager v1.0.

L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle tecniche di Real-time PCR e procedure diagnostiche in vitro. Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Per ottenere risultati ottimali della PCR è necessario attenersi rigorosamente al manuale utente.

Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare componenti scaduti.

I campioni con DNA di scarsa qualità/quantità (ad esempio, valori C_t di ACTB che rientrano appena nei criteri di ammissibilità; valori C_t compresi tra 25 e 26,4) potrebbero essere considerati falsi-negativi. È consigliabile la ripetizione del test in singolo. Un risultato negativo per il test ripetuto indica che il campione è negativo all'ipermetilazione, un risultato positivo indica che il campione è positivo all'ipermetilazione.

Tutti i reagenti forniti con il QIAsure Methylation Test sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo kit. In caso contrario potrebbero derivarne conseguenze sulle prestazioni.

Il QIAsure Methylation Test è convalidato per donne positive all'HPV.

Il QIAsure Methylation Test è convalidato per i campioni cervicali raccolti e conservati in terreni PreservCyt, SurePath™ o STM, e per i campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola conservati in PreservCyt all'arrivo in laboratorio.

Soltanto il Rotor-Gene Q MDx è stato approvato per l'uso con l'esame della PCR con QIAsure Methylation Test.

Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o qualsiasi alterazione dei relativi componenti esenteranno Self-screen B.V. da qualsiasi responsabilità.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di Self-screen.

Caratteristiche delle prestazioni

Limite di sensibilità (Limit of Detection, LOD)

La sensibilità analitica del QIAsure Methylation Test è stata determinata come limite di sensibilità al 95% (Limit of Detection, LOD 95%), utilizzando una serie di diluizioni del plasmide contenente tutte e tre le sequenze degli ampliconi (in altre parole, *ACTB*, *FAM19A4* e *hsa-mir124-2*; intervallo tra 750.000 e 0,25 copie per PCR). Il LOD 95% per i target è stato definito come la diluizione più bassa del plasmide ad aver prodotto almeno 35 risultati positivi su 36 ($C_T < 40$). Complessivamente sono stati eseguiti 12 esperimenti da 4 operatori (1 seduta per operatore al giorno) con 3 lotti e 3 sistemi RGQ diversi. Ogni esperimento comprendeva un test triplice di 11 diluizioni plasmidiche. Il LOD 95% è stato di 7,5 copie per PCR per tutti e 3 i target.

Linearità

La linearità dell'esame QIAsure è stata determinata con i dati dei 12 esperimenti eseguiti per valutare il LOD 95%. I due target *FAM19A4* e *hsa-mir124-2* e l'*ACTB* di riferimento hanno un'amplificazione lineare compresa tra 750.000 e 7,5 copie per PCR.

Precisione

La precisione del QIAsure Methylation Test è stata determinata come variabilità intra-esame (variabilità dei risultati multipli di campioni con la stessa concentrazione in un unico esperimento) e varianza totale dell'esame (variabilità dei risultati multipli dell'esame generati da operatori, su strumenti, con lotti e in laboratori diversi). I test sono stati eseguiti su campioni di DNA convertito con bisolfite, estratti da campioni cervicali positivi all'HPV ad alto rischio, che avevano generato risultati positivi all'ipermetilazione e segnali sia per il target *FAM19A4* che per il target *hsa-mir124-2* pari a circa 3 volte la concentrazione LOD. I test sono stati eseguiti in duplicato nel corso di 8 sedute da 4 operatori (una seduta per operatore al giorno), utilizzando 2 lotti e 3 strumenti RGQ diversi in 2 laboratori, così da generare 16 punti dati per campione. È stato calcolato il coefficiente di variazione (CV) per i valori C_T e $\Delta\Delta C_T$ (Tabella 3).

Tabella 3. CV% di valori CT e $\Delta\Delta CT$ in un campione cervicale positivo alla metilazione

	Tipo di campione	Tipo di campione (%)	Tipo di campione (%)
Valore CT	Controllo qualità interno del campione (cioè, ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
Valore $\Delta\Delta CT$	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Lo scarto statistico complessivo in valori C_T di un campione con la concentrazione menzionata è 1,32% per il controllo qualità interno del campione (ACTB), 1,52% per *FAM19A4* e 1,64% per *hsa-mir124-2*. Lo scarto statistico complessivo in valori $\Delta\Delta C_T$ di un campione con la concentrazione menzionata è 5,97% per *FAM19A4* e 5,75% per *hsa-mir124-2*.

Sostanze interferenti

Le sostanze inibitorie selezionate per il loro effetto potenziale sulla PCR erano la desolfonazione e il tampone di lavaggio del kit di conversione con bisolfito. Non sono state analizzate sostanze potenzialmente presenti nel campione originale per il fatto che il DNA del campione viene purificato due volte con le microsfere di silice, ovvero durante l'estrazione del DNA dal campione originale e durante la pulizia del DNA dopo la conversione con il bisolfito. Tracce della desolfonazione e del tampone di lavaggio hanno mostrato un'interferenza nella PCR, rilevata da un risultato di test non valido per il controllo qualità interno del campione.

Prestazioni cliniche

Campioni cervicali positivi all'HPV*

Le prestazioni cliniche del QIAsure Methylation Test ai fini della ricerca delle neoplasie intraepiteliali cervicali di grado 3 (CIN 3) e il carcinoma della cervice uterina (CIN 3+) sono state valutate in uno studio retrospettivo multicentro nella UE (13). Il QIAsure Methylation Test è stato valutato in 2384 campioni di screening cervicale di donne HPV-positive (età 29-76 anni), provenienti da quattro Paesi UE (Scozia, Slovenia, Danimarca, Paesi Bassi) (13). I campioni sono stati raccolti in terreni PreservCyt o SurePath. La popolazione in studio comprendeva 2012 donne senza evidenza di malattia entro 2 anni di follow-up (abbreviato come ≤CIN 1), 124 con CIN 2, 228 con CIN 3 e 20 con cancro. Il DNA è stato estratto dai campioni cervicali e 250 ng di DNA sono stati utilizzati come volume d'ingresso per la reazione di conversione con bisolfito (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Dei 250 ng di DNA convertito, il 20% è stato utilizzato per la PCR (equivalente a 50 ng di DNA target originale per PCR). Di seguito sono riportati i tassi di positività generale dei tassi di positività del QIAsure Methylation Test stratificati in base all'endpoint clinico (Tabella 4).

Tabella 4. Tassi di positività del QIAsure Methylation Test

Endpoint clinico	Frazione	Tasso di positività (95% IC)
≤ CIN 1	437/2012	21,7% (20-23,6)
CIN 2	58/124	46,8% (38,1-56,6)
CIN 3	176/228	77,2% (71,3-82,2)
Cervicocarcinoma	19/20	95,0% (70,7-99,3)

Tra i campioni cervicali positivi all'HPV ad alto rischio, la sensibilità per CIN 3+ è 78,6% (195/248; 95% IC: 73,1-88,3) e la specificità complessiva del QIAsure Methylation Test era 78,3% (n = 2013; 95% IC: 76-80). Il valore predittivo negativo dei risultati hrHPV-positivi, negativi alla metilazione era del 99,9% per il carcinoma della cervice uterina (N = 1694; 95% IC: 99,6-99,99), del 96,9% per CIN3+ (95% IC: 96-98) e del 93,0% per CIN2+ (95% IC: 92-94).

* Campioni cervicali prelevati da un medico.

Inoltre, la sensibilità per il carcinoma della cervice uterina è stata valutata in uno studio retrospettivo multicentro globale, su 519 cancri invasivi con istotipi diversi da più di 25 Paesi (11). Il DNA è stato estratto dai campioni cervicali e 250 ng di DNA sono stati utilizzati come volume d'ingresso per la reazione di conversione con bisolfito (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Dei 250 ng di DNA convertito, il 20% è stato utilizzato per la PCR (equivalente a 50 ng di DNA target originale per PCR). 510 cancri su 519 sono risultati positivi con il QIAsure Methylation Test, con un tasso di positività del 98,3% (95% IC: 96,7-99,2), i tassi di positività stratificati per istotipo sono elencati di seguito nella Tabella 5. Tassi di positività del QIAsure Methylation Test in campioni di cancro della cervice uterina.

Tabella 5. Tassi di positività del QIAsure Methylation Test in campioni di cancro della cervice uterina

Endpoint clinico	Frazione	Tasso di positività (95% IC)
Carcinoma a cellule squamose	313/318	98,4% (96,4-99,5)
Adenocarcinoma	121/123	98,4% (94,2-99,8)
Carcinoma adenosquamoso	42/42	100,0% (91,6-100)
Istotipi tumorali rari	30/32	93,8% (79,2-99,2)
Istotipo tumorale non specificato	4/4	100% (39,8-100,0)

Campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola positivi all'HPV

Per valutare le prestazioni cliniche del QIA sure Methylation Test ai fini della ricerca delle neoplasie intraepiteliali cervicali di grado 3 e del carcinoma della cervice uterina (ad esempio, CIN 3+) su campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola, sono stati analizzanti 247 campioni vaginali positivi all'HPV ad alto rischio. In 14 campioni (5,7%), i valori C_t dell'ACTB erano $> 26,4$ e di conseguenza sono stati considerati non validi. I campioni che hanno prodotto risultati del test validi comprendevano 148 campioni autoprelevati con tampone a spazzola da pazienti con \leq CIN 1 dopo 18 mesi di follow-up, 24 campioni con CIN 2, 50 campioni con CIN 3, 8 campioni con carcinoma a cellule squamose e 3 campioni con adenocarcinoma. Il DNA estratto dai campioni vaginali è stato utilizzato con un volume d'ingresso di 250 ng per la reazione di conversione con bisolfito (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Di questi 250 ng di DNA convertito con bisolfito, il 20% è stato utilizzato per la PCR (equivalente a 50 ng di DNA target originale per PCR). Di seguito sono riportati i tassi di positività del QIA sure Methylation Test stratificati in base all'endpoint clinico (Tabella 6).

Tabella 6. Tassi di positività del QIA sure Methylation Test in campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola

Endpoint clinico	Frazione	Tasso di positività (95% IC)
\leq 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)
Carcinoma a cellule squamose	8/8	100,0% (63,1-100,0)
Adenocarcinoma	3/3	100,0% (29,2-100,0)

Tra i campioni vaginali autoprelevati con tampone a spazzola positivi all'HPV ad alto rischio, la sensibilità per CIN 3+ è 72,1% (44/61; 95% IC: 59,7-81,9) e per il carcinoma 100% (11/11, 95% IC: 72-100).*

* Nota: l'ipermetilazione dei target in campioni di donne che presentano lesioni CIN avanzate e/o tumori della cervice uterina potrebbe rimanere inosservata a causa della variabilità del campionamento, ad esempio a causa di un campionamento inadeguato.

Prestazioni dei target *FAM19A4* e *hsa-mir124-2* ai fini della rilevazione delle lesioni CIN trasformanti avanzate

L'analisi della metilazione del promotore della cellula ospite rileva specificamente le cosiddette lesioni CIN "avanzate", che presentano un profilo di metilazione tipico tumorale e hanno un elevato rischio a breve termine di progressione in cancro (7, 8). Per valutare le prestazioni dell'analisi dell'ipermetilazione del promotore per i target *FAM19A4* e *hsa-mir124-2*, sono stati analizzati 29 campioni HPV-positivi ad alto rischio appartenenti a pazienti con lesioni CIN 2/3 trasformanti avanzate e 19 campioni positivi all'HPV ad alto rischio appartenenti a pazienti con lesioni CIN 2/3 trasformanti iniziali. La metilazione è stata in particolare associata alla malattia avanzata, ottenendo un punteggio per tutte le lesioni CIN 2/3 avanzate (100%; 29/29; 95% IC: 88-100) positive a ipermetilazione, rispetto al 47% (9/19; 95% IC: 27-69) delle lesioni CIN 2/3 precoci.

Robustezza

La robustezza del QIAsure Methylation Test è stata determinata come concordanza tra l'output del QIAsure Methylation Test e quello di una versione per solo uso di ricerca (RUO) dell'esame. I test sono stati eseguiti su DNA genomico convertito con bisolfito, estratto da 10 campioni cervicali positivi all'HPV ad alto rischio. Di questi, 5 campioni erano stati precedentemente identificati come negativi all'ipermetilazione per entrambi i marcatori e altri 5 campioni erano stati identificati come positivi alla metilazione (per almeno uno dei 2 marcatori). I test sono stati eseguiti in duplicato nel corso di 8 sedute da 4 operatori (una seduta per operatore al giorno), utilizzando 2 lotti e 3 strumenti Rotor-Gene Q MDx diversi in 2 laboratori. In totale, sono stati ottenuti 16 punti dati per ciascun campione (Tabella 7).

Tabella 7. Concordanza tra il QIAsure Methylation Test e la versione RUO dell'esame.

Numero campione	Risultato RUO	Concordanza Lab 1 rispetto a RUO	Concordanza Lab 2 rispetto a 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)
Subtotale		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)
Subtotale		100% (40/40)	100% (40/40)

Quattro dei cinque campioni precedentemente identificati come negativi alla metilazione hanno dimostrato il 100% di concordanza sull'uso del QIAsure Methylation Test in entrambi i laboratori. Il campione 3 mostrava una concordanza del 62,5% (5/8) in entrambi i laboratori. Variazione osservata relativa a *FAM19A4* con livelli intorno al cut-off dell'esame. La concordanza globale tra i campioni negativi alla metilazione è stata del 92,5% (37/40).

Per i 5 campioni precedentemente identificati come positivi alla metilazione, la concordanza è stata del 100% con l'esame di riferimento, pertanto la concordanza totale è stata del 100% (40/40).

Conversione con bisolfito direttamente su campioni cervicali

Il protocollo “Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit” (Conversione con bisolfito direttamente su campioni cervicali utilizzando il EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit) è stato verificato rispetto al protocollo di riferimento (cioè la conversione con bisolfito con precedente controllo quantità di DNA del campione) su 119 strisci cervicali seguiti da QIAsure Methylation Test. Il tasso di successo per la conversione con bisolfito direttamente su campioni cervicali utilizzando il 2,5% del volume d’ingresso di campioni cervicali è stato del 95,8% (114/119) ed è aumentato al 100% dopo aver nuovamente testato i risultati non validi con il 10% del volume d’ingresso di campioni cervicali. La concordanza nel risultato del QIAsure Methylation Test tra i protocolli di conversione con bisolfito è stata del 90,8% (108/119; valore kappa 0,75).

Il protocollo “Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the QIASymphony Bisulfite Kit” (Conversione con bisolfito direttamente su campioni cervicali utilizzando il QIASymphony Bisulfite Kit) è stato verificato rispetto al protocollo di riferimento (cioè la conversione con bisolfito con precedente controllo quantità di DNA del campione) su 120 strisci cervicali seguiti da QIAsure Methylation Test. Il tasso di successo per la conversione con bisolfito direttamente su campioni cervicali utilizzando il 2,5% del volume d’ingresso di campioni cervicali è stato del 94,2% (113/120) rispetto al 97,5% (117/120) con il protocollo di riferimento. La concordanza nel risultato del QIAsure Methylation Test tra i protocolli di conversione con bisolfito è stata del 94,7% (107/113; valore kappa 0,88).

Riferimenti

1. Costello, J.F., and Plass, C. (2001) Methylation matters. *J. Med. Genet.* 38, 285–303.
2. Wilting, 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. *Methods* 25, 402–8.
10. De Strooper, L.M., et al. (2018) Cervical cancer risk in HPV-positive women after a negative FAM19A4/miR124-2 methylation test: A post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow-up. *Int. J. Cancer* 143, 1541–1548.

11. Vink, F.J. et al. (2020). FAM19A4/miR124-2 methylation in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *Int J Cancer.* 147, 1215-1221.
- Kremer, W.W. et al. (2022). Clinical Regression of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Is Associated With Absence of FAM19A4/miR124-2 DNA Methylation (CONCERVE Study). *J. Clin. Oncol.* doi: 10.1200/JCO.21.02433
12. Bonde, J. et al. (2020). Methylation markers FAM19A4 and miR124-2 as triage strategy for primary human papillomavirus screen positive women: A large European multicenter study. *Int J Cancer.* 1-1014.
13. Vink et al, IJC, 2021 - Classification of high-grade cervical intraepithelial neoplasia by p16ink4a, Ki-67, HPV E4 and FAM19A4/miR124-2 methylation status demonstrates considerable heterogeneity with potential consequences for management

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Data di scadenza
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Simbolo del marchio CE-IVD
	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Componenti
	Contiene
	Numero
Rn	"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione
	Codice GTIN (Global Trade Item Number)
	Limite di temperatura
	Produttore
	Tenere al riparo dalla luce



Consultare le istruzioni per l'uso



Cautela

Informazioni di contatto

Per assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare i servizi tecnici QIAGEN all'indirizzo www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800- 22- 44- 6000, o contattare uno dei reparti di assistenza tecnica QIAGEN o i distributori locali (vedere il retro della copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
QIAxure Methylation Test Kit	Per 72 reazioni: 2 miscele master, 2 calibratori.	616014
QIAxphony SP	Modulo per la preparazione dei campioni QIAxphony; include la garanzia di 1 anno su parti e manodopera (opzionale per l'estrazione automatizzata)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclato per Real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione (High Resolution Melt, HRM) a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori; include 1 anno di garanzia con la copertura di parti e interventi, installazione e formazione.	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclato per Real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione (High Resolution Melt, HRM) a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori; include 1 anno di garanzia su parti e manodopera; non include installazione e formazione	9002032

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Accessori del Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione con pipetta a un canale in 72 provette da 0,1 mL	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1mL (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
Rotor-Gene AssayManager: per i test di routine con gli strumenti Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene AssayManager	Software per test di routine in combinazione con gli strumenti Rotor-Gene Q e QIAsymphony RGQ; software con licenza unica per l'installazione su un solo computer	9022739

Per informazioni aggiornate sulle licenze e sulle esclusioni di responsabilità specifiche del prodotto, vedere il manuale del kit o il manuale dell'utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente.

Cronologia delle revisioni del documento

Data	Modifiche
R4, giugno 2019	Rivisto il diagramma di flusso della procedura del flusso di lavoro in Principio e Procedura; Aggiunto EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit in Materiale necessario ma non fornito; Rivisto il contenuto nel box Informazioni sulla sicurezza; Aggiunte informazioni sulla seduta di riscaldamento per RGQ MDx 5-plex HRM; Rivista la sezione Preparazione dei campioni; Aggiunta una voce aggiuntiva alla risoluzione dei problemi; Aggiunto l'argomento sulla conversione con bisolfito direttamente su campioni cervicali in Caratteristiche delle prestazioni; Aggiornata la sezione Riferimenti; Aggiornamenti del layout
R5, luglio 2023	Aggiunta strumentazione QIASymphony per l'automatizzazione opzionale dell'estrazione e QIASymphony Bisulfite kit nel materiale necessario ma non in dotazione; rivista la sezione sulla preparazione dei campioni; aggiunto l'uso del terreno di raccolta SurePath; rivista la sezione sulle prestazioni cliniche. Aggiunti titoli per la tabella 5 e la tabella 6.

Contratto di licenza limitato per QIAsure Methylation Test

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce alcuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espresa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Self-screen B.V. è il produttore legale del QIAsure Methylation Test.

Il QIAsure Methylation Test è prodotto da Self-screen B.V. e distribuito da QIAGEN in Europa.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, digene®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, (QIAGEN Group); BD®, SurePath® (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyt® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.). I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.

07-2023 HB-2304-005 1132288IT © 2023 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com