

Lipiec 2023 r.

QIASure™ Methylation Test

Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)



Wersja 1

Do użytku z aparatem Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM



616014



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



1132288PL

Spis treści

Przeznaczenie	4
Podsumowanie i objaśnienie	5
Zasada procedury	5
Dostarczane materiały	7
Zawartość zestawu	7
Materiały wymagane, ale niedostarczane	7
Ostrzeżenia i środki ostrożności	10
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	10
Ogólne środki ostrożności	10
Środki ostrożności dotyczące profili oprogramowania AssayManager	12
Przechowywanie i sposób postępowania z odczytnikami	13
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami	14
Przygotowanie próbek przechowywanych w podłożu PreservCyt	16
Przygotowanie próbek przechowywanych w podłożu SurePath™	19
Ogólne zalecenia dotyczące konwersji wodorosiarczynem	20
Protokół: Reakcja PCR testu QIASure Methylation Test wykonywana w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	21
Interpretacja wyników	34
Rozwiązywanie problemów	39
Ograniczenia	42
Parametry skuteczności	44
Granica wykrywalności (Limit of Detection, LOD)	44

Liniowość	44
Precyzja	44
Substancje zakłócające.....	45
Skuteczność kliniczna	46
Odporność.....	49
Literatura	52
Symbole	54
Informacje kontaktowe.....	55
Informacje dotyczące zamawiania.....	56
Historia zmian dokumentu	59

Przeznaczenie

Test QIASure Methylation Test (nr kat. 616014) to oznaczenie oparte na swoistej dla metylacji reakcji multipleks real-time PCR przeznaczone do detekcji hipermetylacji promotorów genów *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*. Za pomocą testu QIASure Methylation Test można badać DNA, który poddano konwersji wodorosiarczynem po wyizolowaniu z próbek pobranych na jeden z podanych niżej sposobów:

- próbki z szyjki macicy pobrane (przez lekarza) za pomocą wyrobu *digene*® HC2 DNA Collection Device;
- próbki z szyjki macicy pobrane (przez lekarza) za pomocą szczoteczki/miotelki do wymazów cytologicznych i przeniesione do roztworu PreservCyt® Solution lub SurePath™ Solution;
- próbki z pochwy pobrane (przez pacjentkę) za pomocą szczoteczki/miotelki do wymazów cytologicznych.

Wskazania dotyczące stosowania:

1. jako test kontrolny u kobiet z pozytywnym wynikiem testu na obecność wirusa brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus, HPV) w celu określenia konieczności skierowania na kolposkopię lub inne dalsze procedury;
2. jako test kontrolny u kobiet, u których w badaniu cytologicznym stwierdzono obecność atypowych komórek nabłonka płaskiego o nieokreślonym znaczeniu (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), w celu określenia konieczności skierowania na kolposkopię lub inne dalsze procedury.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez profesjonalnych użytkowników, takich jak technicy i laboranci przeszkoleni w dziedzinie procedur diagnostyki in vitro, technik biologii molekularnej oraz obsługi systemu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

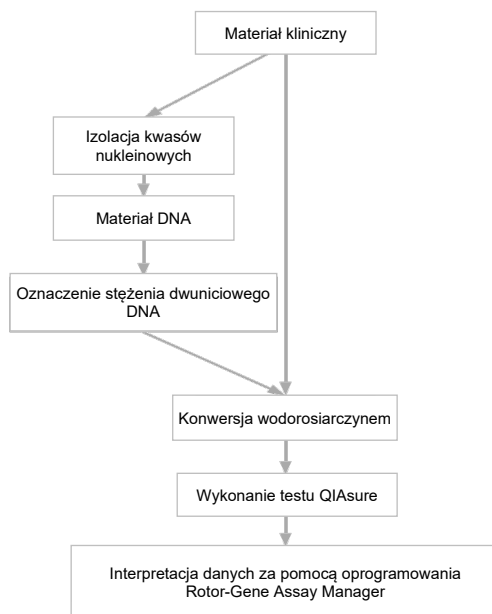
Podsumowanie i objaśnienie

Metylacja DNA to proces biochemiczny, który jest istotny dla prawidłowego rozwoju organizmów wyższych (1). Proces ten obejmuje przyłączenie grupy metylowej w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego nukleotydu cytozynowego. Nieprawidłowe wzorce metylacji DNA pełnią również kluczową rolę w karcynogenezie. W wielu ludzkich nowotworach złośliwych oraz liniach komórek nowotworów złośliwych, w tym w raku szyjki macicy oraz w raku błony śluzowej trzonu macicy, wykryto hipermetylację promotora genu *FAM19A4* (Family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like)member A4) i/lub promotora genu *hsa-mir124-2* (*homo sapiens micro RNA 124-2*) (2–6). Analiza metylacji promotorów w komórce gospodarza umożliwia swoistą detekcję nowotworów złośliwych oraz tak zwanych „zaawansowanych” śródnamionkowych neoplazji szyjki macicy (cervical intraepithelial neoplasia, CIN), których profil metylacji jest zbliżony do profilu obserwowanego w nowotworach złośliwych i które powiązano z wysokim ryzykiem progresji do nowotworu złośliwego w krótkim czasie (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). Oznaczenie QIASure umożliwia detekcję hipermetylacji promotorów genów *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* w DNA, który wyizolowano z próbek z szyjki macicy lub wymazu z pochwy i poddano konwersji wodorosiarczynem. Gen *ACTB* (gen ludzkiej β -aktyny) służy jako wewnętrzna kontrola jakości próbki.

Zasada procedury

Test QIASure Methylation Test to test multipleks real-time PCR, który amplifikuje metylowane regiony promotorów genów supresorowych nowotworów *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*, a także fragment genu referencyjnego, który nie jest swoisty pod względem metylacji. Zestaw zawiera 2 probówki mieszaniny QIASure Master Mix i 2 probówki kalibratora QIASure Calibrator. Mieszanina Master Mix jest przeznaczona do amplifikacji DNA, który wyizolowano z materiałów klinicznych i poddano konwersji wodorosiarczynem. Mieszanina Master Mix zawiera startery i sondy dla genów docelowych i genu referencyjnego, który służy jako wewnętrzna kontrola jakości próbki. Kalibrator to zlinearyzowany plazmid, który zawiera sekwencje amplikonów genów *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* i *ACTB*.

Procedura przepływu pracy



Oznaczenie QIASure jest wykonywane w aparacie Rotor-Gene Q MDx, a oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager® automatycznie przeprowadza analizę i interpretację danych. Wartość C_T (cykl progowy) odpowiada liczbie cykli PCR, które musiały zajść, aby była możliwa detekcja sygnału fluorescencyjnego powyżej sygnału tła. Wartość ta jest skorelowana z liczbą cząsteczek docelowych obecnych w próbce. Podczas oznaczenia QIASure wartość ΔC_T jest obliczana jako różnica między wartością C_T docelowego genu *FAM19A4* lub *hsa-mir124-2* a wartością C_T genu referencyjnego (ACTB). Otrzymana wartość ΔC_T to względna ilościowa wartość poziomu metylacji promotora genu *FAM19A4* lub *hsa-mir124-2*. W celu normalizacji wyników wartość ΔC_T próbki kalibratora jest odejmowana od wartości ΔC_T docelowego genu *FAM19A4* lub *hsa-mir124-2*, co daje wartość $\Delta\Delta C_T$ (9). Kalibrator to wystandaryzowana próbka zawierająca małą liczbę kopii plazmidowego DNA o znanej liczbie kopii trzech genów docelowych (tj. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* i ACTB).

Dostarczane materiały

Zawartość zestawu

QIASure Methylation Test		72
Nr katalogowy		616014
Liczba reakcji		72
QIASure Master Mix (2 próbówki)	Brązowa próbówka	630 µl
QIASure Calibrator (2 próbówki)	Przezroczysta próbówka	25 µl
QIASure Methylation Test — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)		1

Materiały wymagane, ale niedostarczane

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Materiały eksploatacyjne i odczynniki do przygotowania próbek pobranych przez pacjentkę

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Odczynniki do przygotowania próbek przechowywanych w podłożu do pobierania próbek SurePath.

- Bufor Buffer AL (QIAGEN, numer katalogowy: 19075)

Materiały eksploatacyjne i odczynniki do konwersji wodorosiarczynem

Zweryfikowano następujące zestawy do konwersji wodorosiarczynem:

- Zestaw EZ DNA Methylation Kit (ZYMO Research, nr kat. D5001 lub nr kat. D5002)
- Zestaw EZ DNA Methylation-Lighting (ZYMO Research, nr kat. D5030 lub nr kat. D5031)
- Zestaw EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, nr kat. 59720)
- Zestaw QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN, nr kat. 931106)

Materiały eksploatacyjne do aparatu Rotor-Gene Q MDx

- Probówki w paskach i zatyczki, 0,1 ml (nr kat. 981103)
- Woda oczyszczona (np. o klasie czystości do biologii molekularnej, destylowana lub dejonizowana)

Wypożyczenie

- Pipety (z regulacją)* przeznaczone do przygotowywania reakcji PCR (1–10 µl; 10–100 µl)
- Rękawiczki jednorazowe
- Wirówka laboratoryjna* umożliwiającą wirowanie przy >10 000 rpm
- Wytrząsarka*
- Fluorometr Qubit® (Thermo Fisher Scientific, nr kat. Q33216), fluorospektrometr NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, nr kat. ND-3300) lub równoważny aparat
- System QIASymphony SP System (nr kat. 9001297) do opcjonalnej zautomatyzowanej izolacji i/lub konwersji wodorosiarczynem

* Upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

Wypożyczenie potrzebne do przeprowadzenia reakcji real-time PCR

- System Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (nr kat. 9002033) lub aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (nr kat. 9002032)*
- Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager Core Application w wersji 1.0.x (gdzie „x” jest równe lub większe niż 4)
- Zainstalowane narzędzie Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in w wersji 1.0.x (gdzie „x” jest równe lub większe niż 1)
- Profil oznaczenia QIASure Assay Profile (z pliku AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)(gdzie „Y” jest większe niż lub równe 1) w przypadku wykorzystywania DNA, który wyizolowano z próbek z szyjki macicy pobranych przez lekarza i poddano konwersji wodorosiarczynem
- Profil oznaczenia QIASure Assay Profile przeznaczony do próbek pobranych samodzielnie szczoteczką cytologiczną (z pliku AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)(gdzie „Y” jest większe niż lub równe 0) w przypadku wykorzystywania DNA, który wyizolowano z próbek wymazu z pochwy pobranych przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną i poddano konwersji wodorosiarczynem

* Aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM wyprodukowany w styczniu 2010 r. lub później. Data produkcji jest zawarta w numerze seryjnym znajdującym się z tyłu aparatu. Numer seryjny ma format „mmrrnnn”, gdzie „mm” oznacza miesiąc produkcji (cyfry), „rr” oznacza dwie ostatnie cyfry roku produkcji, a „nnn” oznacza unikalny identyfikator aparatu.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Wyłącznie do celów diagnostyki in vitro.

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym, kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN®.

QIASURE MASTER MIX



Zawiera: 1,2,4-triazol: Niebezpieczeństwo! Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki. Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy.

Ogólne środki ostrożności

Podczas przeprowadzania testów PCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami.

Zawsze należy mieć na uwadze poniższe zalecenia:

- Podczas pracy z próbkami należy nosić jednorazowe rękawiczki bezpudrowe, fartuch laboratoryjny i okulary ochronne.
- Należy chronić próbki i zestaw przed zanieczyszczeniami mikrobiologicznymi i nukleazami (DNazami). DNazy mogą spowodować rozkład matrycy DNA.
- Należy unikać przenoszenia zanieczyszczeń w postaci DNA lub produktów PCR, co mogłoby powodować uzyskanie fałszywie pozytywnego sygnału.
- Zawsze należy używać jednorazowych końcówek do pipet wolnych od DNaz z barierami aerozolowymi.
- Odczynniki oznaczenia QIASure są optymalnie rozcieńczone. Nie należy dalej rozcieńczać odczynników, gdyż może to doprowadzić do utraty skuteczności.
- Wszystkie odczynniki dostarczone w zestawie QIASure są przeznaczone do stosowania wyłącznie z odczynnikami z tego samego zestawu. Nie należy zastępować żadnego odczynnika z jednego zestawu tym samym odczynnikiem z innego zestawu QIASure, nawet jeśli są one z tej samej partii, gdyż może to wpłynąć na skuteczność.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury można znaleźć w podręczniku użytkownika aparatu Rotor-Gene Q MDx.
- Przed pierwszą reakcją wykonywaną danego dnia należy wykonać program rozgrzewający aparat Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM w temperaturze 95°C przez 10 minut.
- Zmiana czasów i temperatur inkubacji może spowodować otrzymanie błędnych lub sprzecznych danych.
- Nie należy używać składników zestawu po upływie daty ważności lub w przypadku, gdy były niewłaściwie przechowywane.
- Czas ekspozycji składników na światło powinien być zminimalizowany: właściwości mieszanin reakcyjnych mogą ulec zmianie pod wpływem światła.
- Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia mieszanin syntetycznymi materiałami, które są zawarte w odczynnikach do reakcji PCR.
- Pozostałości próbek i odczynników używanych do oznaczenia należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Środki ostrożności dotyczące profili oprogramowania AssayManager

Do różnych typów próbek wymagane są różne profile oprogramowania AssayManager. Należy upewnić się, że stosowany jest profil odpowiedni do badanego typu próbki, zgodnie z poniższymi wytycznymi:

- Do wykonywania testów na DNA, który wyizolowano z próbek z szyjki macicy pobranych przez lekarza i poddano konwersji wodorosiarczynem, musi być używany „Profil oznaczenia QIASure Assay Profile przeznaczony do próbek zeszkrobin z kanału szyjki macicy (z pliku AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)”.
- Do wykonywania testów na DNA, który wyizolowano z próbek wymazu z pochwy pobranych przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną i poddano konwersji wodorosiarczynem, musi być używany „Profil oznaczenia QIASure Assay Profile przeznaczony do próbek pobranych samodzielnie szczoteczką cytologiczną (z pliku AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)”

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Warunki transportu

Test QIAure Methylation Test jest transportowany na suchym lodzie. Jeśli którykolwiek składnik testu QIAure Methylation Test nie był zamrożony w chwili odbioru, opakowanie zewnętrzne zostało otwarte podczas transportu lub przesyłka nie zawiera listu przewozowego, instrukcji obsługi lub odczynników, należy skontaktować się z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (informacje znajdują się na tylnej stronie okładki lub pod adresem www.qiagen.com).

Warunki przechowywania

Test QIAure Methylation Test musi zostać natychmiast po dostarczeniu umieszczony w zamrażarce o stałej temperaturze od -30 do -15°C bez dostępu światła.

Stabilność

Test QIAure Methylation Test zachowuje stabilność do upływu terminu ważności podanego na etykiecie opakowania, jeśli jest przechowywany w określonych warunkach.

Po otwarciu odczynniki należy przechowywać w oryginalnych opakowaniach w temperaturze od -30 do -15°C. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania. Nie przekraczać maksymalnej liczby 3 cykli zamrażania-rozmrażania.

- Przed otwarciem delikatnie wymieszać przez 10-krotne odwrócenie probówki i zwirować wszystkie probówki.
- Daty ważności dla każdego odczynnika są określone na etykietach poszczególnych składników. W prawidłowych warunkach przechowywania skuteczność produktu zostanie zachowana w okresie stabilności, jeżeli będą używane składniki pochodzące z tej samej partii.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

PRZESTROG



Wszystkie próbki powinny być traktowane jako materiał potencjalnie zakaźny.

Próbki z szyjki macicy

Zestaw QIASure jest przeznaczony do użytku z próbkami genomowego DNA, który wyizolowano z próbek z szyjki macicy i poddano konwersji wodorosiarczynem. Zwalidowane podłoża do pobierania próbek z szyjki macicy (zeskrobin) to podłoża do pobierania próbek PreservCyt® i SurePath™ oraz podłoże transportowe *Digene* Specimen Transport Medium (STM). Optymalna temperatura przechowywania próbek klinicznych po dostarczeniu do laboratorium wynosi 2–8°C. W tych warunkach przechowywania próbki w podłożu do pobierania próbek PreservCyt lub SurePath™ są stabilne przez 3 miesiące przed izolacją DNA.

Uwaga: Probki z szyjki macicy w podłożu STM mogą być transportowane w temperaturze 2–30°C w celu dostarczenia ich następnego dnia do laboratorium, w którym przeprowadzane są testy. Po dostarczeniu takich próbek należy je ponownie zamrozić w temperaturze -20°C.

Próbki wymazu z pochwy pobrane przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną

Zestaw QIASure Methylation Test jest przeznaczony do użytku z próbkami genomowego DNA, który wyizolowano z próbek wymazu z pochwy pobranych przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną i poddano konwersji wodorosiarczynem. Próbki wymazu z pochwy pobierane przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną mogą być pobierane i transportowane na sucho, natomiast po dostarczeniu do laboratorium przechowywane w zalecanej objętości (2–3 ml) podłoża do pobierania próbek PreservCyt. Próbki w podłożu do pobierania próbek PreservCyt mogą być przechowywane w temperaturze 2–8°C lub w temperaturze pokojowej przez maksymalnie 3 miesiące.

Próbki genomowego DNA

Po wyizolowaniu genomowego DNA próbki DNA mogą być przechowywane i transportowane w temperaturze od -30°C do -15°C przez maksymalnie 12 miesięcy.

Przygotowanie próbek przechowywanych w podłożu PreservCyt

Test QIASure Methylation Test zwalidowano do użytku z genomowym DNA, który wyizolowano z próbek z szyjki macicy i poddano konwersji wodorosiarczynem. Genomowy DNA można poddać konwersji wodorosiarczynem:

- i) po izolacji DNA z próbki i kontroli jakości DNA;
- ii) bezpośrednio w próbce z szyjki macicy przy użyciu zestawu EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, nr kat. 59720);
- iii) bezpośrednio w próbce z szyjki macicy przy użyciu zestawu QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN, nr kat. 931106).

Poniżej przedstawiono zalecenia dotyczące tego procesu.

- **i) Konwersja wodorosiarczynem po izolacji DNA i kontroli jakości DNA**

W przypadku tego protokołu konwersji wodorosiarczynem przed rozpoczęciem protokołu należy wyizolować DNA i wykonać pomiar stężenia DNA, a następnie odmierzyć optymalną objętość eluatu. Protokół ten został zweryfikowany dla zestawu EZ DNA Methylation™ Kit (nr kat. D5001) i zestawu EZ DNA Methylation-Lightning Kit (nr kat. D5030) firmy ZYMO Research. Zalecamy korzystanie z następujących metod:

- Izolacja DNA

Z testem QIASure Methylation Test są zgodne standardowe zestawy do izolacji DNA (np. zestawy oparte na kolumnach lub kulkach magnetycznych).

- Pomiar stężenia DNA

Przed konwersją DNA wodorosiarczynem należy zmierzyć stężenie DNA.

Odpowiednie systemy do pomiaru stężenia DNA to Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba firmy Thermo Fisher Scientific) lub równoważne aparaty.

- Wydzielenie odpowiedniej porcji eluatu DNA
Optymalna wejściowa ilość DNA do reakcji konwersji wodorosiarczynem mieści się w zakresie od 100 ng do 2 µg, przy czym ilość zalecana do reakcji konwersji wodorosiarczynem wynosi 200 ng. Jeśli stężenie DNA jest zbyt niskie do reakcji konwersji wodorosiarczynem, należy powtórzyć izolację DNA, używając większej wejściowej objętości próbki klinicznej lub przeprowadzić elucję DNA w mniejszej objętości elucji.
- Konwersja wodorosiarczynem za pomocą zestawu EZ DNA Methylation Kit i zestawu EZ DNA Methylation-Lightning Kit jest przeprowadzana zgodnie z zaleceniami producenta.

Uwaga: Zgodnie z instrukcją zestawu EZ DNA Methylation Kit, aby uzyskać wystarczająco wysoką wydajność reakcji konwersji wodorosiarczynem (>98%), maksymalna ilość DNA w próbce nie powinna przekraczać 2 µg.

- **ii) Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio w próbkach z szyjki macicy przy użyciu zestawu EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit**

Wykonywanie konwersji wodorosiarczynem bezpośrednio w próbce z szyjki macicy pobranej do roztworu PreservCyt® Solution zweryfikowano dla zestawu EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit firmy QIAGEN. Procedura ta powinna być wykonywana zgodnie z zaleceniami producenta w przypadku próbek o wysokim stężeniu DNA (1 ng – 2 µg) zawartymi w dokumencie *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion — Instrukcja obsługi* z wyjątkiem następujących punktów:

- Krok 1 protokołu. Pobrać 2,5% próbki z szyjki macicy w podłożu do pobierania próbek PreservCyt® (tj. 500 µl z 20 ml) i osadzić komórki, wirując przy co najmniej 3390 x g przez 10 minut. Odrzucić supernatant, pozostawiając osad komórkowy w maksymalnie 20 µl podłoża do pobierania próbek PreservCyt. W celu przeprowadzenia reakcji konwersji wodorosiarczynem należy użyć tej próbki osadu komórkowego i przejść do kroku 2 protokołu producenta.
- Bufor Buffer BL: Nie dodawać nośnika RNA.
- Objętość elucji DNA po konwersji wodorosiarczynem jest równa 50 µl buforu Buffer EB na każdą próbkę.

- ***iii) Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio w próbkach z szyjki macicy przy użyciu zestawu QIASymphony Bisulfite Kit***

Wykonywanie konwersji wodorosiarczynem bezpośrednio w próbce z szyjki macicy pobranej do roztworu PreservCyt® Solution zweryfikowano dla zestawu QIASymphony Bisulfite Kit firmy QIAGEN. **Testy powinny być wykonywane zgodnie z zaleceniami producenta zawartymi w instrukcji obsługi zestawu QIASymphony Bisulfite.**

- Pobrać 2,5% próbki z szyjki macicy w podłożu do pobierania próbek PreservCyt® (tj. 500 µl z 20 ml) i osadzić komórki, wirując przy co najmniej 3390 x g przez 10 minut. Odrzucić supernatant, pozostawiając osad komórkowy w maksymalnie 20 µl pozostałego podłoża do pobierania próbek PreservCyt.
- W przypadku reakcji konwersji wodorosiarczynem należy postępować zgodnie z „Kartą protokołu QIASymphony SP — Bisulfite 140_HC_V”, zaczynając od kroku 2; zamiast DNA należy użyć osadu komórkowego.
- Po zakończeniu reakcji konwersji wodorosiarczynem należy rozpocząć program SP w aparacie QIASymphony, postępując zgodnie z krokami opisanymi w protokole „Konwersja niemetylowanych cytozyn wodorosiarczynem w różnych typach próbek” w instrukcji obsługi zestawu QIASymphony Bisulfite Kit. Elucja jest wykonywana w 40 µl.

Przygotowanie próbek przechowywanych w podłożu SurePath™

Próbki przechowywane w podłożu SurePath muszą zostać poddane obróbce wstępnej przed izolacją DNA. Test QIASure Methylation Test zwalidowano do użytku z genomowym DNA, który wyizolowano z próbek z szyjki macicy i poddano konwersji wodorosiarczynem, zgodnie z procedurą przedstawioną poniżej.

- Pobrać 2,5% próbki z szyjki macicy.
- Wirować przez 10 minut przy 4000 x g, usunąć supernatant, lecz pozostawić 100 µl podłoża SurePath™.
- Dodać 100 µl odczynnika Buffer AL i ponownie zawiesić osad.
- Dobrze wymieszać i inkubować przez 20 minut w temperaturze 90°C.
- Chłodzić przez 5 min w temperaturze pokojowej.
- Wykonać izolację DNA przy użyciu zestawu QIAamp DNA Mini Kit (lub równoważnego produktu) zgodnie z instrukcjami producenta; eluować DNA w 50 µl.
- Zmierzyć stężenie DNA; odpowiednie systemy do pomiaru stężenia to Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba firmy Thermo Fisher Scientific) lub równoważne aparaty.
- Do przeprowadzenia konwersji wodorosiarczynem zalecane jest użycie 200 ng DNA; jeśli 200 ng nie jest dostępne, należy użyć maksymalnej objętości wejściowej. Wykonać konwersję przy użyciu zestawu EZ DNA Methylation Kit lub EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo) zgodnie z instrukcjami producenta. Użyć 2,5 µl eluatu do wykonania testu QIASure Methylation Test.

Ogólne zalecenia dotyczące konwersji wodorosiarczynem

Reakcję konwersji wodorosiarczynem należy wykonywać w specjalnie wyznaczonym do tego celu miejscu, w którym nie jest przechowywana ani dozowana mieszanina QIASure Master Mix, aby uniknąć zanieczyszczenia odczynników.

Objętość wejściowa dla reakcji QIASure wynosi 2,5 µl DNA po konwersji wodorosiarczynem.

Jeśli wewnętrzna kontrola jakości próbki jest negatywna (tj. wartości C_T uzyskane dla genu ACTB są $>26,4$), w procesie przygotowania próbki DNA po konwersji wodorosiarczynem uzyskano niewystarczającą ilość materiału i/lub materiał o niewystarczającej jakości. Wynik takiej próbki jest uznawany za nieważny. Wykonać wymagane kroki, aby osiągnąć wartość C_T genu ACTB, która mieści się w zakresie ważnych wartości dla następujących protokołów:

- Konwersja wodorosiarczynem po izolacji DNA i kontroli ilości DNA: powtórzyć reakcję konwersji wodorosiarczynem, używając większej wejściowej ilości DNA z próbki i/lub powtórzyć izolację DNA, używając większej wejściowej ilości próbki z szyjki macicy
- Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio na próbkach z szyjki macicy: powtórzyć reakcję konwersji wodorosiarczynem, używając 10%* próbki z szyjki macicy w podłożu do pobierania próbek PreservCyt (tj. 2 ml z 20 ml).

DNA po konwersji wodorosiarczynem można przechowywać przez maksymalnie 24 godziny w temperaturze 2–8°C, przez maksymalnie 5 dni w temperaturze od -25 do -15°C i przez maksymalnie 3 miesiące w temperaturze poniżej -70°C. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania DNA po konwersji wodorosiarczynem. Należy ograniczyć liczbę cykli rozmrażania-zamrażania do maksymalnie trzech, aby zachować wystarczającą jakość.

* Jeśli skuteczność nie jest zadowalająca ze względu na zmienność podczas pobierania próbek, np. wynikającą z niedokładnego poboru próbek, można zwiększyć objętość próbki używaną do bezpośredniej reakcji konwersji wodorosiarczynem.

Protokół: Reakcja PCR testu QIASure Methylation Test wykonywana w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem protokołu należy zapoznać się z obsługą aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Patrz podręcznik użytkownika aparatu (nr kat. 9002033 lub 9002032).
- Przed pierwszą reakcją wykonywaną danego dnia należy wykonać program rozgrzewający aparat Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM w temperaturze 95°C przez 10 minut.
- Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 umożliwia zautomatyzowaną interpretację wyników reakcji PCR. Zestaw QIASure musi być wykorzystywany w aparacie Rotor-Gene Q MDx przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0. Należy poświęcić odpowiedni czas na zapoznanie się z obsługą oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 (nr kat. 9022739) i narzędzia Epsilon Plug-In oraz przeczytać ich podręczniki użytkownika.
- Do różnych typów próbek wymagane są różne profile oznaczeń Rotor-Gene AssayManager v1.0 Assay Profile. Należy upewnić się, że stosowany jest profil odpowiedni do badanego typu próbki, zgodnie z poniższymi wytycznymi:
 - Do wykonywania testów na DNA, który wyizolowano z próbek z szyjki macicy pobranych przez lekarza i poddano konwersji wodorosiarczynem, musi być używany „Profil oznaczenia QIASure Assay Profile przeznaczony do próbek zeszkrobionych z kanału szyjki macicy (z pliku AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)”
 - Do wykonywania testów na DNA, który wyizolowano z próbek wymazu z pochwy pobranych przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną i poddano konwersji wodorosiarczynem, musi być używany „Profil oznaczenia QIASure Assay Profile przeznaczony do próbek pobranych samodzielnie szczoteczką cytologiczną (z pliku AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)”

* Aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM wyprodukowany w styczniu 2010 r. lub później. Data produkcji jest zawarta w numerze seryjnym znajdującym się z tyłu aparatu. Numer seryjny ma format „mmrrnnn”, gdzie „mm” oznacza miesiąc produkcji (cyfry), „rr” oznacza dwie ostatnie cyfry roku produkcji, a „nnn” oznacza unikalny identyfikator aparatu.

Uwaga: W jednym eksperymencie można badać tylko jeden typ próbki. Poszczególne profile oznaczeń zostały zoptymalizowane dla danych typów próbek i w celu uzyskania optymalnych wyników dla określonego typu próbki kluczowe jest, aby klienci wybrali odpowiedni profil Assay Profile.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0.x (gdzie „x” jest większe niż lub równe 4) musi być zainstalowane na komputerze podłączonym do aparatu Rotor-Gene Q MDx. Szczegółowe informacje na temat instalacji oprogramowania Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application zawiera *Podręcznik użytkownika oprogramowania Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application*.
- Do testu QIASure Methylation Test wymagane jest określone narzędzie o nazwie „Epsilon Plug-in” (wersja 1.0.1 lub wyższa). Narzędzie to można pobrać ze strony internetowej firmy QIAGEN: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Narzędzie to należy zainstalować na komputerze, na którym jest już zainstalowane oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0.x (gdzie „x” jest równe lub większe niż 4).
- Aby wykonanie testu QIASure Methylation Test przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 było możliwe, wymagany jest określony profil oznaczenia. Profil oznaczenia Assay Profile zawiera wszystkie parametry wymagane do wykonywania cykli i analizowania eksperymentu. Istnieją 2 profile oznaczeń QIASure Assay Profile:
 - „Profil oznaczenia QIASure Assay Profile przeznaczony do próbek zeszkrobionych z kanału szyjki macicy (z pliku AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)” odpowiada próbkom z szyjki macicy pobranym przez lekarza;

- „Profil oznaczenia QIASure Assay Profile przeznaczony do próbek pobranych samodzielnie szczoteczką cytologiczną (z pliku AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)” odpowiada próbkom wymazu z pochwy pobranym przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną. Profile te można pobrać ze strony internetowej testu QIASure Methylation Test: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Profil oznaczenia musi zostać zaimportowany do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager. Uwaga: Zestaw QIASure może zostać użyty tylko pod warunkiem, że w oprogramowaniu Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 zaprogramowano określone ustawienia konfiguracji.

Aby zapewnić bezpieczeństwo procesowe całego systemu, należy ustawić następujące wymagane ustawienia konfiguracji w trybie zamkniętym:

- „Material number required” (Wymagany numer materiału)
- „Valid expiry date required” (Wymagana ważna data ważności)
- „Lot number required” (Wymagany numer serii)

Instalacja narzędzia Epsilon Plug-in i importowanie profilu oznaczenia

Szczegółowe informacje dotyczące instalacji i importowania narzędzia Epsilon Plug-in i profilu oznaczenia zawiera *Podręcznik użytkownika oprogramowania Rotor-Gene AssayManager Core Application* i *Podręcznik użytkownika narzędzia Epsilon Plug-in*.

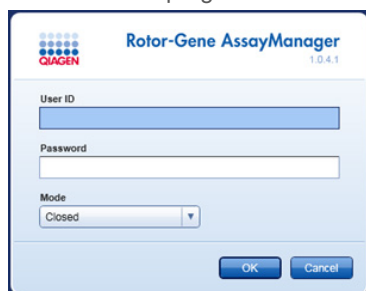
- Pobierz narzędzie Epsilon Plug-in i najnowszą wersję profilu oznaczenia QIASure ze strony internetowej firmy QIAGEN.
- Rozpocznij proces instalacji, klikając dwukrotnie plik **EpsilonPlugin.Installation.msi**, a następnie postępuj zgodnie z instrukcjami instalacji. Szczegółowy opis tego procesu zawiera rozdział „Instalowanie narzędzi” w *Podręczniku użytkownika aplikacji podstawowej oprogramowania AssayManager*.

Uwaga: Aby zapewnić bezpieczeństwo procesowe całego systemu, wybrać kartę **Settings** (Ustawienia) i zaznaczyć pola wyboru opcji **Material number required** (Wymagany numer materiału), **Valid expiry date required** (Wymagana ważna data ważności) i **Lot number required** (Wymagany numer serii) dla trybu zamkniętego (sekcja Work list (Lista robocza)). Jeśli nie są one włączone (wybrane), kliknąć, aby je włączyć.

- Po pomyślnym zainstalowaniu narzędzia osoba posiadająca uprawnienia administratora do oprogramowania Rotor Gene AssayManager będzie musiała wykonać następujące czynności, aby zaimportować profil oznaczenia AP_QIASure_V1_0_Y.iap.

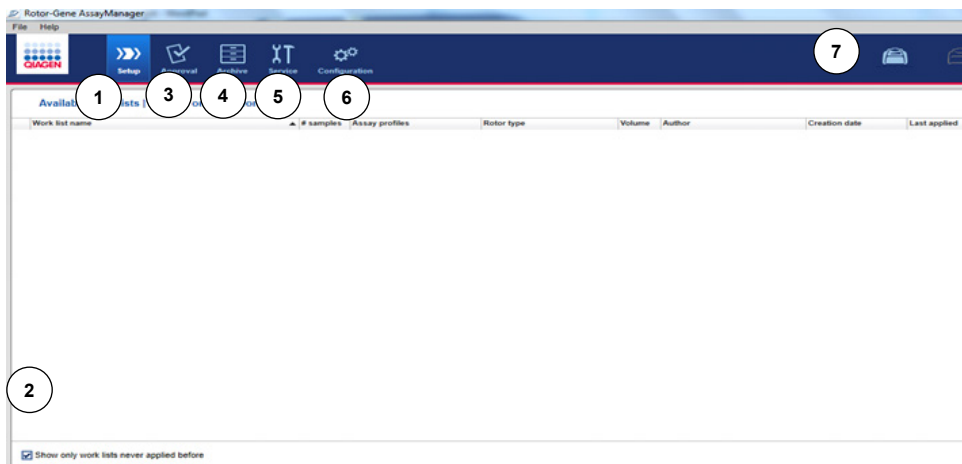


1. Otwórz oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager, klikając ikonę. Zostanie otwarte okno oprogramowania Rotor-Gene AssayManager (patrz Ryc. 1).



Ryc. 1. Ekran logowania do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager.

2. Zaloguj się do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager, używając identyfikatora użytkownika i hasła. Nie wprowadzaj zmian w trybie „Closed” (Zamknięty). Kliknij przycisk **OK**. Zostanie otwarty ekran oprogramowania Rotor-Gene Assay Manager (patrz poniżej).



- 1 Karta **Set-up** (Ustawienia). Na tej karcie możliwe jest zarządzanie listami roboczymi lub zastosowanie list roboczych.
- 2 Zaznaczenie zastosowanych list roboczych powoduje wyświetlenie wyłącznie nowych list roboczych.
- 3 Karta **Approval** (Zatwierdzanie). Na tej karcie możliwe jest wyszukanie poprzednich eksperymentów (reakcji).
- 4 Karta **Archive** (Archiwum). Na tej karcie możliwe jest wyszukanie starych eksperymentów (reakcji), które zostały już zatwierdzone.
- 5 Karta **Service** (Konservacja). Na tej karcie wyświetlany jest raport dotyczący ścieżki audytu każdego pliku wygenerowanego przez oprogramowanie.
- 6 Karta **Configuration** (Konfiguracja). Na tej karcie możliwe jest skonfigurowanie wszystkich parametrów oprogramowania.
- 7 Ikony aparatu Rotor-Gene Q MDx.



Nie połączono



Połączono

3. Wybierz środowisko konfiguracyjne.
4. Wybierz kartę **Assay Profiles** (Profile oznaczeń).
5. Kliknij opcję **Import** (Importuj).
6. Wybierz profil oznaczenia AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap dla próbek z szyjki macicy i/lub profil oznaczenia AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap, aby zaimportować go do okna dialogowego, a następnie kliknij opcję **Open** (Otwórz).

7. Po pomyślnym zaimportowaniu profilu oznaczenia można go używać w środowisku „Setup” (Ustawienia).

Uwaga: Nie można zaimportować tej samej wersji profilu oznaczenia po raz drugi.

Przetwarzanie próbek w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 probówki

W czasie jednej reakcji (eksperymentu), poza kalibratorem i kontrolą bez matrycy (no template control, NTC), można zbadać maksymalnie 70 próbek DNA po konwersji wodorosiarczynem. Schemat w Tabeli 1 przedstawia przykładowy rozkład próbek w bloku ładowania lub rotorze dla reakcji z wykorzystaniem testu QIASure Methylation Test. Liczby oznaczają pozycje w bloku ładowania i wskazują końcowe pozycje w rotorze.

Tabela 1. Ustawienia płytki i rotora dla reakcji z wykorzystaniem zestawu QIASure w aparacie Rotor-Gene Q MDx

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



PRZESTROGA

Próbówki należy włożyć do rotora w sposób wskazany w Tabeli 1. Zautomatyzowana analiza skonfigurowana w profilu oznaczenia opiera się na takim układzie. W przypadku zastosowania innego układu zostaną uzyskane wyniki odbiegające od normy.

Uwaga: We wszystkich niewykorzystanych pozycjach należy umieścić puste próbówki.

Reakcja PCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 probówki

Przed pierwszą reakcją wykonywaną danego dnia należy wykonać program rozgrzewający aparat Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM w temperaturze 95°C przez 10 minut.

1. Dla próbek, które mają być przetwarzane, należy utworzyć listę roboczą, wykonując następujące czynności:
 - 1a. Włącz aparat Rotor-Gene Q MDx.
 - 1b. Otwórz oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager i zaloguj się jako użytkownik o roli operatora w trybie zamkniętym.
 - 1c. Kliknij opcję **New work list** (Nowa lista robocza) w menedżerze listy roboczej (środowisko „Setup” (Ustawienia)).
 - 1d. Wybierz profil **QIASure assay profile** (Profil oznaczenia QIASure) z listy dostępnych profili oznaczeń.

Uwaga: Profil oznaczenia AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap odnosi się do próbek z szyjki macicy; profil oznaczenia AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap odnosi się do próbek wymazu z pochwy pobranych przez pacjentkę.

Uwaga: W jednym eksperymencie można badać tylko jeden typ próbki.
 - 1e. Kliknij opcję **Move** (Przenieś), aby przenieść wybrany profil oznaczenia na listę **Selected assay profiles** (Wybrane profile oznaczeń). Profil oznaczenia powinien być teraz wyświetlany na liście „Selected assay profiles” (Wybrane profile oznaczeń).
 - 1f. Wpisz liczbę próbek w odpowiednie pole.
 - 1g. Wpisz następujące informacje o zestawie QIASure, które są wydrukowane na wieczku pudełka.
 - Numer materiału: 1102417
 - Ważna data ważności w formacie RRRR-MM-DD
 - Numer serii

- 1h. Wybierz krok **Samples** (Próbki). Na ekranie oprogramowania AssayManager zostanie wyświetlona lista zawierająca szczegóły dotyczące próbek. Lista przedstawia oczekiwany układ rotora.
- 1i. Na listę wpisz numery identyfikacyjne próbek oraz wszelkie opcjonalne informacje o próbkach jako komentarz do każdej próbki.
- 1j. Wybierz krok **Properties** (Właściwości) i wprowadź nazwę listy roboczej (Ryc. 2).

Ryc. 2. Properties (Właściwości)

- 1k. Zaznacz pole wyboru **is applicable** (ma zastosowanie), a następnie kliknij opcję **Apply** (Zastosuj).
- 1l. Zapisz listę roboczą.
Listę roboczą można wydrukować, aby ułatwić przygotowanie i konfigurację reakcji PCR. Aby wydrukować listę roboczą, naciśnij przycisk **Print work list** (Drukuj listę roboczą). Szczegóły dotyczące próbek stanowią część tej listy roboczej.

Uwaga: Listę roboczą można utworzyć po skonfigurowaniu reakcji w aparacie lub zapisać ją przed włożeniem próbek do aparatu.

2. Skonfiguruj reakcję QIASure.

Aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia reakcji PCR, usilnie zaleca się wykorzystanie komory do PCR z możliwością włączenia lampy UV.

Mieszaninę QIASure Master Mix należy rozdzielać do probówek w miejscu oddzielnym od miejsca, gdzie jest przeprowadzana reakcja konwersji DNA wodorosiarczynem.

Przed użyciem należy przemyć stół roboczy, pipety i statyw na próbówki roztworem degradującym DNA, aby uniknąć zanieczyszczenia matrycą lub nukleazami.

Uwaga: Należy zmieniać końcówkę pipety przy każdej próbówce, aby uniknąć przeniesienia zanieczyszczeń w postaci niespecyficznej matrycy lub mieszaniny reakcyjnej, co mogłoby prowadzić do otrzymania fałszywie pozytywnych wyników.

2a. Całkowicie rozmrozić mieszaninę QIASure Master Mix i kalibrator QIASure Calibrator i, gdy tylko to możliwe, chronić mieszaninę QIASure Master Mix przed światłem.

Uwaga: Aby uniknąć rozkładu materiału, krok rozmrażania nie powinien trwać dłużej niż 30 minut.

2b. Przed użyciem delikatnie wymieszaj przez 10-krotne odwrócenie próbówki i krótko wiruj.

2c. Dodaj po 17,5 µl gotowej do użycia mieszaniny QIASure Master Mix do odpowiednich próbek w pasku. Reakcję można przygotowywać w temperaturze pokojowej.

2d. Aby uniknąć rozkładu materiału, mieszaninę QIASure Master Mix należy ponownie umieścić w zamrażarce.

2e. Probówki należy przenieść w inne miejsce i tam dodać próbki kontroli oznaczenia oraz próbki po konwersji wodorosiarczynem.

2f. Dodaj po 2,5 µl wody do **kontroli bez matrycy (NTC)** na pozycji 2 (patrz Tabela 1 powyżej). Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.

2g. Dodaj 2,5 µl kalibratora QIASure Calibrator na pozycję 1 (patrz Tabela 1 powyżej). Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół, a następnie zamknij próbówkę zatyczką.

2h. Dodaj 2,5 µl DNA po konwersji wodorosiarczynem do odpowiedniej próbówki. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.

2i. Po napełnieniu zestawu 4 próbek należy zamknąć próbówki.

Uwaga: Probówki do PCR mogą być przechowywane w temperaturze 2–8°C, w ciemności, do 30 minut od czasu rozpipetowania próbek do próbek do PCR do momentu rozpoczęcia eksperymentu w urządzeniu.

- 2j. Aby uniknąć rozkładu materiału, kalibrator QIASure Calibrator należy ponownie umieścić w zamrażarce.

Uwaga: Należy zmieniać końcówkę pipety przy każdej próbówce, aby uniknąć przeniesienia zanieczyszczeń w postaci niespecyficznego matrycy lub mieszaniny reakcyjnej, co mogłoby prowadzić do otrzymania fałszywie pozytywnych wyników.

3. Przygotuj aparat Rotor-Gene Q MDx i rozpocznij reakcję (eksperyment) w następujący sposób:

- 3a. Umieść 72-pozycyjny rotor w uchwycie na rotor.
3b. Załaduj paski próbek do rotora zgodnie z przypisanymi pozycjami, zaczynając od pozycji 1, jak pokazuje to Tabeli 1, a w niewykorzystanych dołkach umieść puste paski próbek z zamkniętymi wieczkami.

Uwaga: Należy upewnić się, że pierwsza próbówka została umieszczona w pozycji 1, a próbówki w paskach są umieszczone w prawidłowej orientacji i odpowiednich pozycjach, zgodnie ze wskazaniem w Tabeli 1.

- 3c. Zamocuj pierścień blokujący.
3d. Załaduj rotor z pierścieniem blokującym do aparatu Rotor-Gene Q MDx, a następnie zamknij pokrywę aparatu.
3e. W oprogramowaniu Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 wybierz odpowiednią listę roboczą z menedżera list roboczych, a następnie kliknij przycisk **Apply** (Zastosuj), lub jeśli lista robocza jest wciąż otwarta, kliknij przycisk **Apply** (Zastosuj).

Uwaga: Jeśli lista robocza dla reakcji nie została utworzona, przed wykonaniem kolejnych czynności należy zalogować się do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 i wykonać krok 1.

- 3f. Wpisz nazwę reakcji (eksperymentu).
3g. Wybierz cykl, który ma być używany, na liście **Cycler selection** (Wybór cyklera).
3h. Upewnij się, że pierścień blokujący jest prawidłowo zamocowany, a następnie potwierdź na ekranie, że zamocowano pierścień blokujący.

- 3i. Kliknij przycisk **Start experiment** (Rozpocznij eksperyment).
Powinna rozpocząć się reakcja wykonywana w ramach testu QIASure Methylation Test.
4. Po zakończeniu reakcji kliknij przycisk **Finish run** (Zakończ reakcję).
5. Udostępnij i zatwierdź wyniki reakcji.
- W przypadku użytkowników posiadających rolę Approver (Osoba zatwierdzająca): kliknij opcję **Release and go to approval** (Udostępnij i przejdź do zatwierdzania).
 - W przypadku użytkowników posiadających rolę Operator: kliknij opcję **Release** (Udostępnij).
6. Udostępnij wyniki.
- Po kliknięciu opcji **Release and go to approval** (Udostępnij i przejdź do zatwierdzania) wyświetlane są wyniki eksperymentu.
 - Po kliknięciu opcji **Release** (Udostępnij) przez użytkownika o roli użytkownika osoba o roli „Approver” (Osoba zatwierdzająca) musi zalogować się do oprogramowania i wybrać środowisko „Approval” (Zatwierdzanie).
 - Odfiltruj listę wg oznaczeń, które oczekują na zatwierdzenie, wybierając opcje filtrowania i klikając opcję **Apply** (Zastosuj).
 - Przejrzyj wyniki, a następnie zatwierdź wyniki każdej badanej próbki.

Przewiń tabelę „Results” (Wyniki) do próbki, która ma zostać zatwierdzona. Na końcu wiersza każdego wyniku próbki, który oczekuje na zatwierdzenie, znajdują się trzy przyciski opcji.

Zaakceptuj lub **odrzuć** wynik próbki.

Uwaga: Wynik, który został automatycznie oznaczony przez oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager jako **INVALID** (Nieważny) nie może zostać przekształcony w ważny wynik, nawet po odrzuceniu.

Opcjonalnie: Wpisz komentarz w polu Sample comment (Komentarz do próbki).

- Kliknij opcję **Release/Report data** (Udostępnij/raportuj dane).

- Kliknij przycisk **OK**. Raport zostanie wygenerowany w formacie Adobe Portable Document (.pdf) i będzie automatycznie przechowywany we wstępnie zdefiniowanym folderze. Domyślna ścieżka folderu to: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports** (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Eksport > Raporty)

Uwaga: Ścieżkę i folder można zmienić w środowisku „Configuration” (Konfiguracja).

- Przejdź na kartę **Archive** (Archiwum), aby wyeksportować plik .rex odpowiadający danym surowym. Odszukaj eksperyment, korzystając z opcji filtrowania, a następnie kliknij opcję **show assays** (pokaż oznaczenia). Następnie kliknij opcję **Export .rex file** (Eksportuj plik .rex) i zapisz plik, klikając przycisk **OK**. Oprogramowanie automatycznie zapisuje plik .rex w następującym wstępnie zdefiniowanym folderze: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments** (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Eksport > Eksperymenty)

Uwaga: Ścieżkę i folder można zmienić na karcie **Specify the .rex file export destination** (Określ docelowy folder do eksportu pliku .rex).

Uwaga: Do rozwiązywania problemów wymagany jest pakiet wsparcia z reakcji. Pakiety wsparcia można wygenerować ze środowiska zatwierdzania lub archiwizacji. Patrz *Podręcznik użytkownika oprogramowania Rotor-Gene AssayManager Core Application*, Rozwiązywanie problemów, „Tworzenie pakietu wsparcia” pod adresem <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Ponadto może okazać się przydatna ścieżka audytu z czasu wystąpienia zdarzenia (± 1 dzień). Ścieżkę audytu można uzyskać w środowisku Service (Konserwacja) (*Podręcznik użytkownika oprogramowania Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Rozładuj aparat Rotor-Gene Q MDx i usuń próbkę w paskach zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Interpretacja wyników

Analiza jest w pełni zautomatyzowana.

Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 najpierw analizuje krzywe amplifikacji i może unieważnić krzywe, które nie spełniają wymagań, na podstawie ich kształtu i amplitudy szumu. W takim przypadku do unieważnionej krzywej zostanie przypisana flaga (patrz Tabela 2).

Następnie oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 przeanalizuje kontrole reakcji.

- Kalibrator
- NTC

Uwaga: Raport generowany po zakończeniu reakcji przedstawia wyniki uzyskane dla kontroli reakcji wraz z flagami unieważniającymi umieszczonymi przed nieważnymi danymi.

Jeśli wszystkie kontrole reakcji spełniają wymagania, oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager przeanalizuje nieznane próbki.

Tabela 2 przedstawia flagi unieważniające próbki, które mogą zostać przypisane do poszczególnych próbek podczas analizy wykonywanej przez oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0, wraz z objaśnieniami znaczenia poszczególnych flag.

Tabela 2. Unieważniające flagi próbek i opis warunków

Flaga	Znaczenie	Opis
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Nieważny)	Wartość docelowa jest wyższa niż zdefiniowany zakres. Może to dotyczyć wartości C_T , fluorescencji w punkcie końcowym, stężenia lub obliczonej wartości, np. średniej wartości C_T lub wartości ΔC_T .
ASSAY_INVALID	Invalid (Nieważny)	Oznaczenie jest nieważne, ponieważ co najmniej jedna kontrola zewnętrzna jest nieważna.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Nieważny)	Wartość docelowa jest niższa niż zdefiniowany zakres. Może to dotyczyć wartości C_T , fluorescencji w punkcie końcowym, stężenia lub obliczonej wartości, np. średniej wartości C_T lub wartości ΔC_T .
CONSECUTIVE_FAULT	Invalid (Nieważny)	Wartość docelowa użyta do obliczenia danej wartości docelowej jest nieważna.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Invalid (Nieważny)	Krzywa amplifikacji danych surowych ma kształt odbiegający od kształtu oczekiwanego dla tego oznaczenia. Istnieje wysokie prawdopodobieństwo uzyskania nieprawidłowych wyników lub błędnej interpretacji wyników.
FLAT_BUMP	Invalid (Nieważny)	Krzywa amplifikacji danych surowych ma kształt „równego wyrzuszenia”, który odbiega od kształtu oczekiwanego dla tego oznaczenia. Istnieje wysokie prawdopodobieństwo uzyskania nieprawidłowych wyników lub błędnej interpretacji wyników (np. określenia nieprawidłowej wartości C_T).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Ważny)	Kontrola NTC wykazuje wartości sygnału C_T powyżej 36 dla sekwencji docelowej genu ACTB.
INVALID_CALCULATION	Invalid (Nieważny)	Obliczenie danej wartości docelowej zakończyło się niepowodzeniem.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Invalid (Nieważny)	Krzywa amplifikacji przecina wartość progową więcej niż jeden raz. Nie można wyznaczyć jednoznacznej wartości C_T .
NO_BASELINE	Invalid (Nieważny)	Nie odnaleziono wartości początkowej dla wstępnej linii podstawowej.
NO_CT_DETECTED	Variable (Zmienna)	Nie wykryto wartości C_T dla danej sekwencji docelowej.
NO_VALUE	Invalid (Nieważny)	Sekwencja docelowa nie dała żadnej wartości, a zgodnie z oczekiwaniami powinna dać wartość. Wartość ta nie musi być w określonym zakresie. Może to dotyczyć wartości C_T , fluorescencji w punkcie końcowym, stężenia lub obliczonej wartości (np. średniej wartości C_T lub wartości ΔC_T).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Warning (Ostrzeżenie)	Odchylenie podczas procedury normalizacji. Krzywa amplifikacji jest wyświetlana z domyślną normalizacją; wyniki należy ręcznie sprawdzić pod kątem poprawności.

Tabela 2. Unieważniające flagi próbek i opis warunków

OTHER_TARGET_INVALID	Invalid (Nieważny)	Inna wartość docelowa dla tej samej próbki jest nieważna.
SATURATION	Invalid (Nieważny)	Surowe dane fluorescencji są silnie nasycone przed punktem przegięcia krzywej amplifikacji.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warning (Ostrzeżenie)	Surowe dane fluorescencji są nasycone w fazie plateau krzywej amplifikacji.
SPIKE	Warning (Ostrzeżenie)	W surowych danych fluorescencji wykryto pik na krzywej amplifikacji, ale jest on poza regionem, w którym określono wartość C_T .
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Invalid (Nieważny)	Wykryto pik na krzywej amplifikacji blisko wartości C_T .
STEEP_BASELINE	Invalid (Nieważny)	Na krzywej amplifikacji wykryto stromo rosnącą linię podstawową dla surowych danych fluorescencji.
STRONG_BASELINE_DIP	Invalid (Nieważny)	Na krzywej amplifikacji wykryto silny spadek linii podstawowej dla surowych danych fluorescencji.
STRONG_NOISE	Invalid (Nieważny)	Poza fazą wzrostu krzywej amplifikacji wykryto silny szum.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Invalid (Nieważny)	W fazie wzrostu (fazie wykładniczej) krzywej amplifikacji wykryto silny szum.
UNCERTAIN	Variable (Zmienna)	Wyniki z automatycznego skanowania danych (AUDAS) są sprzeczne z wynikami z podstawowej analizy. Nie jest możliwe przeprowadzenie jednoznacznej automatycznej oceny ważności danych.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable (Zmienna)	Dla sekwencji docelowej, która nie powinna być amplifikowana, wykryto wartość C_T .
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Nieważny)	Dla sekwencji docelowej otrzymano wartość, a zgodnie z oczekiwaniami nie powinna ona dać wartości. Może to dotyczyć wartości C_T , fluorescencji w punkcie końcowym, stężenia lub obliczonej wartości, np. średniej wartości C_T lub wartości ΔC_T .
UPSTREAM	Variable (Zmienna)	Status próbki został ustawiony na Invalid (Nieważny) lub Unclear (Niejasny) we wcześniejszym procesie (np. w aparacie QIAAsymphony). Uwaga: W przypadku próbek, które są oznaczone jako niejasne, działanie programu Rotor-Gene AssayManager jest definiowane w środowisku „Configuration” (Konfiguracja) oprogramowania AssayManager. Flagi „Invalid” (Nieważny) ustawione we wcześniejszych procesach zawsze skutkują unieważnieniem odpowiadającej im próbki w oprogramowaniu Rotor-Gene AssayManager.

Tabela 2. Unieważniające flagi próbek i opis warunków

WAVY_BASE_FLUORESCENCE

Invalid
(Nieważny)

Na krzywej amplifikacji wykryto falistą linię podstawową dla surowych danych fluorescencji.

- Jeśli wszystkie kontrole reakcji są ważne, oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0 przeanalizuje nieznane próbki. Aby możliwa była interpretacja wyników, w próbce musi znajdować się minimalna ilość DNA po konwersji wodorosiarczynem. Jest to określane na podstawie wartości C_T genu metabolizmu podstawowego ACTB; wartość ta musi być $\leq 26,4$ dla próbki, aby oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager mogło uznać daną próbkę za ważną.
- Następnie zostaną obliczone wartości $\Delta\Delta C_T$ dla genów *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* i zostanie podany wynik. Jeśli wartość $\Delta\Delta C_T$ jest poniżej punktu odcięcia, gen docelowy jest oceniany jako „Hypermethylation positive” (Pozytywny pod względem hipermetylacji).

Uwaga: Częściowe lub niskie poziomy metylacji to naturalne zjawisko, które, w przeciwieństwie do hipermetylacji, nie jest bezpośrednio związane z rozwojem raka.

- Próbkę przypisywany jest status „Hypermethylation positive” (Pozytywny pod względem hipermetylacji), gdy co najmniej jeden z genów docelowych jest oceniany jako „Hypermethylation positive” (Pozytywny pod względem hipermetylacji).
- Próbki zawierające DNA o niskiej jakości/ małą ilość DNA (tj. wartości C_T ACTB ledwo spełniające kryteria akceptacji; wartości C_T mieszczące się w zakresie od 25 do 26,4) mogą zostać ocenione jako fałszywie negatywne. Zalecane jest ponowne wykonanie reakcji PCR w jednym powtórzeniu. Wynik negatywny dla powtórzonego testu oznacza, że próbka jest negatywna pod względem hipermetylacji, a wynik pozytywny oznacza, że próbka jest pozytywna pod względem hipermetylacji.
- W przypadku próbek o wysokiej komórkowości przetwarzanych przy użyciu protokołu bezpośredniej konwersji istnieje ryzyko przeciążenia reakcji PCR zbyt dużą ilością DNA, co może prowadzić do uzyskania fałszywie negatywnego wyniku dla docelowej sekwencji genu *FAM19A4*. Z tego względu w przypadku próbek 1) o negatywnym wyniku hipermetylacji, 2) o wartości C_T dla genu ACTB ≤ 23 , 3) o wartości $\Delta\Delta C_T$ dla genu *FAM19A4* wynoszącej od 10,36 do 11,36 zalecane jest ponowne wykonanie

reakcji PCR z zastosowaniem 5-krotnie mniejszej wejściowej ilości DNA po konwersji, uzyskanej poprzez rozcieńczenie próbki wodą.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może być przydatna w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy również zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z serwisu technicznego firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej stronie okładki lub pod adresem www.qiagen.com).

Informacje na temat rozwiązywania problemów związanych z oprogramowaniem Rotor-Gene AssayManager zawiera *Podręcznik użytkownika oprogramowania Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Komentarze i wskazówki

Ogólne postępowanie	
Stężenie DNA w próbce jest zbyt niskie do przeprowadzenia konwersji wodorosiarczynem	
Należy zmierzyć wyizolowane DNA	Powtórzyć izolację DNA, używając bardziej stężonej próbki klinicznej
Wynik dla próbki jest nieważny: amplifikacja genu ACTB jest zbyt niska lub nie występuje	
a) Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników	Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji. Powtórzyć reakcję PCR.
b) Sprawdzić stężenie DNA	Maksymalnie zwiększyć wejściową ilość DNA do reakcji konwersji wodorosiarczynem. Reakcja konwersji wodorosiarczynem ma optymalną skuteczność przy wejściowej ilości DNA w zakresie 100 ng–2 µg.
c) W przypadku protokołu „Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio w próbkach z szyski macicy” należy sprawdzić komórkowość próbki klinicznej	Powtórzyć reakcję konwersji wodorosiarczynem, używając 10% próbki z szyski macicy w podłożu do pobierania próbek PreservCyt (tj. 2 ml z 20 ml).
d) Sprawdzić eluat po konwersji wodorosiarczynem	Powtórzyć konwersję wodorosiarczynem; w razie potrzeby można użyć większej wejściowej ilości DNA.

Komentarze i wskazówki

Wynik dla próbek jest nieważny: nieprawidłowe wyniki dla docelowego genu *FAM19A4* i/lub *hsa-mir124-2*

Niedostateczne wymieszanie	Wymieszać próbkę i mieszaninę reakcyjną, pipetując w górę i w dół (około 10 razy każdą próbkę). Powtórzyć badanie próbki.
----------------------------	---

Wynik kontroli pozytywnej jest nieważny: amplifikacja jest zbyt niska lub nie występuje dla jednej lub większej liczby sekwencji docelowych

a) Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników	Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji. Powtórzyć reakcję PCR.
b) Częściowa degradacja	Zawartość zestawu przechowywać w temperaturze od -30 do -15°C. Unikać ponownego zamrażania i rozmrażania więcej niż trzy razy.
c) Częściowy rozkład odczynników do PCR	Zawartość zestawu przechowywać w temperaturze od -30 do -15°C i chronić mieszaniny reakcyjne przed światłem. Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.
d) Odwrócenie probówek w pasku	Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji.
e) Data ważności	Sprawdzić datę ważności używanego zestawu.
f) Zbyt długa przerwa między pipetowaniem próbek i rozpoczęciem reakcji	Mieszaniny do reakcji PCR można przechowywać w temperaturze 2–8°C, w ciemności, przez 30 minut od czasu dodania próbek do mieszanin do reakcji PCR do momentu rozpoczęcia reakcji w urządzeniu.

Kontrola bez matrycy (NTC) jest nieważna

a) Błąd pipetowania	Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji. Powtórzyć reakcję PCR.
b) Zanieczyszczenie krzyżowe	Wymienić wszystkie kluczowe odczynniki. Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, należy zawsze postępować z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.
c) Zanieczyszczenie odczynnika	Wymienić wszystkie kluczowe odczynniki. Aby uniknąć zanieczyszczenia spowodowanego przeniesieniem, należy zawsze postępować z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.
d) Odwrócenie probówek w pasku	Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji.
e) Zbyt długa przerwa między pipetowaniem próbek i rozpoczęciem reakcji	Mieszaniny do reakcji PCR można przechowywać w temperaturze 2–8°C, w ciemności, przez 30 minut od czasu dodania próbek do mieszanin do reakcji PCR do momentu rozpoczęcia reakcji w urządzeniu.
f) Rozkład sondy	Należy chronić mieszaniny reakcyjne przed światłem. Należy sprawdzić, czy na krzywej fluorescencji występuje wynik fałszywie pozytywny.

Brak sygnału lub niski sygnał w próbce pomimo prawidłowej reakcji kontrolnej

- | | |
|---------------------|---|
| a) Efekty hamujące | Należy zawsze sprawdzać, czy w trakcie konwersji wodorosiarczynem po wirowaniu na filtrze nie zostały resztki buforów.
Powtórzyć reakcję konwersji wodorosiarczynem. |
| b) Błąd pipetowania | Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji.
Powtórzyć reakcję PCR. |

Jeśli problem będzie się utrzymywał, należy skontaktować się z serwisem technicznym QIAGEN.

Ograniczenia

Wszystkie odczynniki używane do testu QIASure Methylation Test są przeznaczone wyłącznie do diagnostyki in vitro.

Podczas przeprowadzania testów PCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami.

Odczynniki i instrukcje dostarczone w tym zestawie zostały zwalidowane w celu zapewnienia optymalnej skuteczności.

Test QIASure Methylation Test jest przeznaczony do użycia przez wykwalifikowany personel laboratorium przeszkolony w zakresie używania aparatów Rotor-Gene Q MDx oraz oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 1.0.

Z produktu może korzystać jedynie personel odpowiednio poinstruowany i przeszkolony w zakresie techniki real-time PCR i procedur diagnostycznych in vitro. Wszelkie uzyskane wyniki diagnostyczne należy interpretować wraz z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych.

W celu osiągnięcia optymalnych wyników reakcji PCR należy ściśle stosować się do treści podręcznika użytkownika (instrukcji obsługi).

Należy zwracać uwagę na daty ważności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.

Próbki zawierające DNA o niskiej jakości/ małą ilość DNA (tj. wartości C_T ACTB ledwo spełniające kryteria akceptacji; wartości C_T mieszczące się w zakresie od 25 do 26,4) mogą zostać ocenione jako fałszywie negatywne. Zalecane jest ponowne wykonanie testu w jednym powtórzeniu. Wynik negatywny dla powtórzonego testu oznacza, że próbka jest negatywna pod względem hipermetylacji, a wynik pozytywny oznacza, że próbka jest pozytywna pod względem hipermetylacji.

Wszystkie odczynniki dostarczone w teście QIASure Methylation Test są przeznaczone do stosowania wyłącznie z odczynnikami z tego samego zestawu. W przeciwnym wypadku może dojść do obniżenia skuteczności.

Test QIASure Methylation Test został zwalidowany do użytku z próbkami pobranymi od kobiet, u których stwierdzono obecność wirusa HPV.

Test QIASure Methylation Test został zwalidowany do użytku z próbkami z szyjki macicy pobranymi do podłoża PreservCyt, SurePath™ lub STM i przechowywanymi w tym podłożu oraz z próbkami wymazu z pochwy pobranymi przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną i przechowywanymi w podłożu PreservCyt do czasu dostarczenia do laboratorium.

Do użytku z oznaczeniem metodą PCR wykonywanym w ramach testu QIASure Methylation Test zwalidowano wyłącznie aparat Rotor-Gene Q MDx.

Użycie tego produktu niezgodnie z przeznaczeniem i/lub wprowadzenie zmian w jego składnikach spowoduje zniesienie odpowiedzialności firmy Self-screen B.V.

Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację skuteczności systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami skuteczności wykonanymi przez firmę Self-screen.

Parametry skuteczności

Granica wykrywalności (Limit of Detection, LOD)

Czułość analityczną testu QIASure Methylation Test określono jako 95-procentową granicę wykrywalności (95% LOD), używając serii rozcieńczeń seryjnych plazmidu zawierającego wszystkie trzy sekwencje amplikonów (tj. *ACTB*, *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*; zakres od 750 000 do 0,25 kopii na reakcję PCR). Wartość 95% LOD dla genów docelowych określono jako najniższe rozcieńczenie plazmidu, dla którego uzyskano co najmniej 35 na 36 wyników pozytywnych ($C_T < 40$). Ogółem czterech różnych operatorów wykonało 12 eksperymentów (1 reakcja wykonywana przez jednego operatora na dzień), używając trzech różnych serii zestawu oraz trzech różnych systemów RGQ. Każdy eksperyment obejmował wykonanie testów 11 rozcieńczeń plazmidu w trzech powtórzeniach. Wartość 95% LOD dla wszystkich trzech różnych genów docelowych wyniosła 7,5 kopii na reakcję PCR.

Liniowość

Liniowość oznaczenia QIASure określono na podstawie danych uzyskanych z 12 eksperymentów przeprowadzanych w celu oceny wartości 95% LOD. Dwa geny docelowe, *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*, oraz gen referencyjny *ACTB* charakteryzują się liniową amplifikacją w zakresie od 750 000 do 7,5 kopii na reakcję PCR.

Precyzja

Precyzję testu QIASure Methylation Test określono jako zmienność wewnątrz oznaczenia (zmienność wielu wyników uzyskanych dla próbek o takim samym stężeniu w obrębie jednego eksperymentu) oraz całkowitą wariancję oznaczenia (zmienność wielu wyników oznaczenia wygenerowanych podczas wykonywania testu przez różnych operatorów, na różnych aparatach, w różnych laboratoriach i przy użyciu różnych partii zestawu). Testy wykonywano na DNA po konwersji wodorosiarczynem, wyizolowanym z materiału próbki z szyjki macicy, w którym stwierdzono obecność wirusa HPV wysokiego ryzyka oraz dla którego uzyskano pozytywny

wynik pod względem hipermetylacji — materiał ten dawał sygnały dla obu genów, *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*, odpowiadające około 3-krotnej wartości stężenia LOD. Testy przeprowadzono w dwóch powtórzeniach w 8 reakcjach wykonywanych przez czterech różnych operatorów (jedna reakcja wykonywana przez jednego operatora na dzień), używając dwóch różnych serii zestawu oraz trzech różnych aparatów RGQ w dwóch różnych laboratoriach, w wyniku czego uzyskano 16 punktów danych na próbkę. Określono współczynnik zmienności (CV) dla wartości C_T i $\Delta\Delta C_T$ (Tabela 3).

Tabela 3. CV% wartości C_T i $\Delta\Delta C_T$ w próbkach z szyjki macicy pozytywnych względem metylacji

	Typ próbki	Typ próbki (%)	Typ próbki (%)
Wartość C_T	Wewnętrzna kontrola jakości próbki (tj. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
Wartość $\Delta\Delta C_T$	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Całkowity statystyczny rozkład wartości C_T próbki o wspomnianym stężeniu wynosi 1,32% dla wewnętrznej kontroli jakości próbki (ACTB), 1,52% dla genu *FAM19A4* i 1,64% dla genu *hsa-mir124-2*. Całkowity statystyczny rozkład wartości $\Delta\Delta C_T$ próbki o wspomnianym stężeniu wynosi 5,97% dla genu *FAM19A4* i 5,75% dla genu *hsa-mir124-2*.

Substancje zakłócające

Substancjami hamującymi wybranymi ze względu na ich możliwy wpływ na reakcję PCR były bufor do reakcji desulfonacji i bufor płuczący z zestawu do reakcji konwersji wodorosiarczynem. Substancje potencjalnie obecne w próbce pierwotnej nie były badane ze względu na fakt, że próbkę DNA oczyszcza się dwukrotnie przy użyciu kulek krzemionkowych, tj. podczas izolacji DNA z próbki pierwotnej oraz podczas oczyszczania DNA po reakcji konwersji wodorosiarczynem. Śladowe ilości buforu do reakcji desulfonacji i buforu płuczącego wykazywały wpływ na reakcję PCR, który wykrywano na podstawie nieprawidłowego wyniku testu dla wewnętrznej kontroli jakości próbki.

Skuteczność kliniczna

Próbki z szyjki macicy pozytywne względem wirusa HPV*

Skuteczność kliniczną testu QIASure Methylation Test w odniesieniu do śródnabłonkowych neoplazji szyjki macicy stopnia 3 (CIN 3) oraz raka szyjki macicy (tj. CIN 3+) oceniono w wieloośrodkowym badaniu retrospektywnym na terenie UE (13). Działanie testu QIASure Methylation Test oceniono przy użyciu 2384 pozytywnych względem wirusa HPV próbek z badań przesiewowych pobranych z szyjki macicy kobiet (w wieku 29–76 lat) pochodzących z czterech krajów na terenie UE (Szkocji, Słowenii, Danii i Holandii) (13). Materiał pobrano do podłoża PreservCyt lub SurePath. Populacja badania obejmowała 2012 kobiet bez objawów choroby w ciągu 2 lat obserwacji (w skrócie $\leq$ CIN 1), 124 kobiety ze zmianami CIN 2, 228 kobiet ze zmianami CIN 3 i 20 kobiet z nowotworem złośliwym. Wyizolowano DNA z próbek z szyjki macicy, a następnie użyto 250 ng DNA jako ilości wejściowej do reakcji konwersji wodorosiarczynem (zestaw EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). 20% z 250 ng zmodyfikowanego DNA użyto do reakcji PCR (co odpowiada 50 ng pierwotnego docelowego DNA/PCR). Poniżej przedstawiono ogólny odsetek pozytywnych wyników testu QIASure Methylation Test stratyfikowanych według klinicznych punktów końcowych (Tabela 4).

Tabela 4. Odsetki pozytywnych wyników testu QIASure Methylation Test

Kliniczny punkt końcowy	Stosunek	Odsetek pozytywnych wyników (95-procentowy CI)
$\leq$ 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)
Rak szyjki macicy	19/20	95,0% (70,7–99,3)

Wśród próbek z szyjki macicy pozytywnych względem wirusa HPV wysokiego ryzyka czułość dla zmian CIN 3+ wynosi 78,6% (195/248; 95-procentowy CI: 73,1–88,3), a ogólna swoistość testu QIASure Methylation Test wynosiła 78,3% (n = 2013; 95-procentowy CI: 76–80). Ujemna wartość predykcyjna wyników pozytywnych względem wirusa hrHPV i negatywnych względem metylacji wynosi 99,9% dla raka szyjki macicy (N = 1694; 95-procentowy CI: 99,6–99,99), 96,9% dla zmian CIN3+ (95-procentowy CI: 96–98) i 93,0% dla zmian CIN2+ (95-procentowy CI: 92–94).

* Próbki z szyjki macicy pobrane przez lekarza.

Ponadto poziom czułości dla raka szyjki macicy został oceniony w wielośrodkowym, ogólnosiatowym badaniu retrospektywnym na podstawie 519 przypadków raków inwazyjnych o różnych histotypach, pochodzących z ponad 25 państw (11). Wyizolowano DNA z próbek z szyjki macicy, a następnie użyto 250 ng DNA jako ilości wejściowej do reakcji konwersji wodorosiarczynem (zestaw EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). 20% z 250 ng zmodyfikowanego DNA użyto do reakcji PCR (co odpowiada 50 ng pierwotnego docelowego DNA/PCR). Dla 510 spośród 519 przypadków raków uzyskano pozytywny wynik przy użyciu testu QIASure Methylation Test, co dało odsetek wyników pozytywnych na poziomie 98,3% (95-procentowy CI: 96,7–99,2). Odsetki wyników pozytywnych stratyfikowane według histotypu przedstawiono w Tabeli 5. Odsetki wyników pozytywnych uzyskanych przy użyciu testu QIASure Methylation Test dla próbek raka szyjki macicy poniżej.

Tabela 5. Odsetki wyników pozytywnych uzyskanych przy użyciu testu QIASure Methylation Test dla próbek raka szyjki macicy

Kliniczny punkt końcowy	Stosunek	Odsetek pozytywnych wyników (95-procentowy CI)
Rak płaskonabłonkowy	313/318	98,4% (96,4–99,5)
Gruzołakorak	121/123	98,4% (94,2–99,8)
Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	42/42	100,0% (91,6–100)
Rzadkie histotypy raka	30/32	93,8% (79,2–99,2)
Rak o nieokreślonym histotypie	4/4	100% (39,8–100,0)

Próbki wymazu z pochwy pozytywne względem wirusa HPV pobrane przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną

Skuteczność kliniczną testu QIASure Methylation Test dla próbek wymazu z pochwy pobranych przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną pod względem wykrywania śródnabłonkowych neoplazji szyjki macicy stopnia 3 oraz raka szyjki macicy (tj. CIN 3+) oceniono, badając 247 próbek wymazu z pochwy, w których stwierdzono obecność wirusa HPV wysokiego ryzyka. W 14 próbkach (5,7%) uzyskane wartości C_T dla genu ACTB były $>26,4$ i wyniki te uznano za nieważne. Spośród próbek, dla których uzyskano ważny wynik testu, 148 to próbki pobrane szczoteczką cytologiczną przez pacjentki, u których nie stwierdzono zmian $\leq$ CIN 1 po 18 miesiącach obserwacji, w przypadku 24 próbek stwierdzono CIN 2, 50 — CIN 3, 8 — raka płaskonabłonkowego, a 3 — gruczolakoraka. Wyizolowano DNA z próbek wymazu z pochwy, a następnie użyto 250 ng DNA jako ilości wejściowej do reakcji konwersji wodorosiarczynem (zestaw EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). 20% z 250 ng DNA po konwersji wodorosiarczynem użyto do reakcji PCR (co odpowiada 50 ng pierwotnego docelowego DNA/PCR). Poniżej przedstawiono odsetki pozytywnych wyników testu QIASure Methylation Test stratyfikowane według klinicznych punktów końcowych (Tabela 6).

Tabela 6. Odsetki wyników pozytywnych uzyskanych przy użyciu testu QIASure Methylation Test dla próbek wymazu z pochwy pobranych przez pacjentkę szczoteczką cytologiczną

Kliniczny punkt końcowy	Stosunek	Odsetek pozytywnych wyników (95-procentowy CI)
$\leq$ 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)
Rak płaskonabłonkowy	8/8	100,0% (63,1–100,0)
Gruczolakorak	3/3	100,0% (29,2–100,0)

Wśród próbek wymazu z pochwy pozytywnych względem wirusa HPV wysokiego ryzyka pobranych przez pacjentki szczoteczką cytologiczną czułość dla zmian CIN 3+ wynosi 72,1% (44/61; 95-procentowy CI: 59,7-81,9), a dla raka 100% (11/11, 95-procentowy CI: 72–100).*

* Uwaga: Hipermetylacja docelowych genów w próbkach pobranych od kobiet ze zmianami CIN o stopniu zaawansowanym i/lub rakiem szyjki macicy może pozostać niewykryta ze względu na zmienność podczas pobierania próbek, na przykład w wyniku pobierania próbek w nieprawidłowy sposób.

Skuteczność wykrywania zaawansowanych zmian CIN, które ulegają transformacji, na podstawie genów *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*

Analiza metylacji promotorów w komórce gospodarza umożliwia swoistą detekcję tak zwanych „zaawansowanych” zmian CIN, których profil metylacji jest zbliżony do profilu obserwowanego w nowotworach złośliwych i które powiązano z wysokim ryzykiem progresji do nowotworu złośliwego w krótkim czasie (7, 8). Skuteczność analizy hipermetylacji promotorów genów *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* oceniono, badając 29 próbek, w których stwierdzono obecność wirusa HPV wysokiego ryzyka, pobranych od kobiet z zaawansowanymi zmianami CIN 2/3 ulegającymi transformacji, oraz 19 próbek, w których stwierdzono obecność wirusa HPV wysokiego ryzyka, pobranych od kobiet ze wczesnymi zmianami CIN 2/3 ulegającymi transformacji. Metylację szczególnie powiązano z zaawansowaną chorobą, oceniając jako pozytywne względem hipermetylacji wszystkie zaawansowane zmiany CIN 2/3 (100%; 29/29; 95-procentowy CI: 88–100), natomiast tylko 47% (9/19; 95-procentowy CI: 27–69) spośród wczesnych zmian CIN 2/3.

Odporność

Odporność testu QIAure Methylation Test określono jako zgodność między wynikami testu QIAure Methylation Test a wynikami uzyskanymi za pomocą oznaczenia w wersji przeznaczonej wyłącznie do celów badawczych (Research Use Only, RUO). Testy przeprowadzono na genomowym DNA po konwersji wodorosiarczynem, wyizolowanym z 10 próbek z szyjki macicy pozytywnych pod względem wirusa HPV wysokiego ryzyka, z których 5 zidentyfikowano wcześniej jako negatywne pod względem hipermetylacji dla obu markerów, a 5 jako pozytywne pod względem metylacji (tzn. co najmniej dla jednego z 2 markerów). Testy przeprowadzono w dwóch powtórzeniach w 8 reakcjach wykonywanych przez czterech różnych operatorów (jedna reakcja wykonywana przez jednego operatora na jeden dzień), używając dwóch różnych serii zestawu oraz trzech różnych aparatów Rotor-Gene Q MDx w dwóch różnych laboratoriach. Łącznie dla każdej próbki uzyskano 16 punktów danych (Tabela 7).

Tabela 7. Zgodność wyników testu QIASure Methylation Test z wynikami oznaczenia w wersji RUO

Numer próbki	Wynik oznaczenia RUO	Zgodność w lab. 1. W porównaniu z oznaczeniem RUO	Zgodność w lab. 2. W porównaniu z oznaczeniem 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)
Suma częściowa		92,5% (37/40)	92,5% (37/40)
6	Poz	100% (8/8)	100% (8/8)
7	Poz	100% (8/8)	100% (8/8)
8	Poz	100% (8/8)	100% (8/8)
9	Poz	100% (8/8)	100% (8/8)
10	Poz	100% (8/8)	100% (8/8)
Suma częściowa		100% (40/40)	100% (40/40)

Cztery z pięciu próbek uprzednio zidentyfikowanych jako negatywne względem metylacji wykazały 100% zgodności przy zastosowaniu testu QIASure Methylation Test w obu laboratoriach. Próbką 3 wykazała zgodność na poziomie 62,5% (5/8) w obu laboratoriach. Zaobserwowana zmienność była związana z genem *FAM19A4*, którego stężenia były zbliżone do wartości punktu odcięcia oznaczenia. Ogólna zgodność wyników próbek negatywnych względem metylacji wynosiła 92,5% (37/40).

Wszystkie 5 próbek uprzednio zidentyfikowanych jako pozytywne względem metylacji wykazało 100% zgodności z oznaczeniem referencyjnym, zatem ogólna zgodność wyniosła 100% (40/40).

Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio na próbkach z szyjki macicy

Protokół „Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio w próbkach z szyjki macicy przy użyciu zestawu EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit” zweryfikowano względem protokołu referencyjnego (tj. konwersja wodorosiarczynem po kontroli ilości DNA w próbce) na 119 próbkach zeszkrobin z kanału szyjki macicy, na których następnie wykonano test QIASure Methylation Test. Wskaźnik skuteczności reakcji konwersji wodorosiarczynem wykonywanej bezpośrednio w próbkach z szyjki macicy przy użyciu wejściowej ilości 2,5% próbki z szyjki macicy wynosił 95,8% (114/119) i wzrósł do 100% po ponownym przetestowaniu próbek, dla których uzyskano nieważne wyniki, przy użyciu wejściowej ilości 10% próbki z szyjki macicy. Zgodność wyników testu QIASure Methylation Test między protokołami konwersji wodorosiarczynem wyniosła 90,8% (108/119; wartość kappa 0,75).

Protokół „Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio w próbkach z szyjki macicy przy użyciu zestawu QIAAsymphony Bisulfite Kit” zweryfikowano względem protokołu referencyjnego (tj. konwersja wodorosiarczynem po kontroli ilości DNA w próbce) na 120 próbkach zeszkrobin z kanału szyjki macicy, na których następnie wykonano test QIASure Methylation Test. Wskaźnik skuteczności reakcji konwersji wodorosiarczynem wykonywanej bezpośrednio w próbkach z szyjki macicy przy użyciu wejściowej ilości 2,5% próbki z szyjki macicy wynosił 94,2% (113/120) w porównaniu do 97,5% (117/120) w przypadku protokołu referencyjnego. Zgodność wyników testu QIASure Methylation Test między protokołami konwersji wodorosiarczynem wyniosła 94,7% (107/113; wartość kappa 0,88).

Literatura

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

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
	Termin ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Oznaczono symbolem CE-IVD
	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału
	Składniki
	Zawiera
	Numer
	R oznacza wydanie Instrukcji użycia (Instrukcji obsługi), a n to numer wydania
	Globalny numer jednostki handlowej
	Zakres temperatury
	Producent
	Chronić przed światłem



Zapoznać się z instrukcją użycia



Przeostoga

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego centrum pomocy technicznej dostępną pod adresem www.qiagen.com/Support, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów serwisu technicznego firmy QIAGEN lub lokalnych dystrybutorów (patrz tylna okładka lub strona www.qiagen.com).

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
QIASure Methylation Test Kit	Na 72 reakcje: 2 mieszaniny Master Mix, 2 kalibratory.	616014
QIAAsymphony SP	Moduł QIAAsymphony sample prep; obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę (opcjonalnie do izolacji zautomatyzowanej)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler do reakcji real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, instalację i przeszkolenie	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler do reakcji real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria; obejmuje roczną gwarancję na części i robociznę, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Akcesoria do aparatu Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji jednokanałową pipetą w układzie 72 probówek o pojemności 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 1000 reakcji	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 10 000 reakcji	981106
Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager — do wykonywania rutynowych badań za pomocą aparatów Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene AssayManager	Oprogramowanie przeznaczone do wykonywania rutynowych badań za pomocą aparatów Rotor-Gene Q i QIAAsymphony RGQ; pojedyncza licencja na oprogramowanie do zainstalowania na jednym komputerze	9022739

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika odpowiedniego zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

Ta strona została celowo pozostawiona pusta.

Historia zmian dokumentu

Data	Zmiany
R4, czerwiec 2019 r.	Zmieniono schemat blokowy procedury przepływu pracy w sekcji „Zasada i procedura”; dodano zestaw EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit w sekcji „Materiały wymagane, ale niedostarczane”; zmieniono treść pola informacji dotyczących bezpieczeństwa; dodano informacje o programie rozgrzewającym dla aparatu RGQ MDx 5-plex HRM; zmieniono sekcję „Przygotowanie próbek”; dodano dodatkowy punkt w sekcji rozwiązywania problemów; dodano temat „Konwersja wodorosiarczynem wykonywana bezpośrednio na próbkach z szyjki macicy” w sekcji „Parametry skuteczności”; zaktualizowano sekcję „Piśmiennictwo”; zaktualizowano układ
R5, lipiec 2023 r.	W sekcji „Materiały wymagane, ale niedostarczane” dodano aparat QIASymphony do opcjonalnej automatyzacji izolacji oraz zestaw QIASymphony Bisulfite Kit; poprawiono sekcję „Przygotowanie próbek”; dodano informacje dotyczące użycia podłoża do pobierania próbek SurePath; poprawiono sekcję dotyczącą skuteczności klinicznej. Dodano nagłówki w Tabeli 5 i Tabeli 6.

Umowa ograniczonej licencji dla testu QIASure Methylation Test

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

- Niniejszy produkt może być używany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania tego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw stron trzecich.
- Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji firma QIAGEN nie gwarantuje, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie naruszają praw osób trzecich.
- Zestaw oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedać.
- Firma QIAGEN podkreśla, że nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
- Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązują się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może egzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo żądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronie www.qiagen.com

Firma Self-screen B.V. jest oficjalnym producentem testu QIASure Methylation Test.

Test QIASure Methylation Test jest produkowany przez firmę Self-screen B.V. i dystrybuowany przez firmę QIAGEN w Europie.

Znaki towarowe: 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.).
Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

07-2023 HB-2304-005 1132288PL © 2023 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

