

Июль 2023 г.

QIAzure™ Methylation Test

Инструкции по применению (Руководство)



Версия 1

Для применения с прибором Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM



616014

Self-screen B.V., Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam, The Netherlands (Нидерланды)

1132288RU

Содержание

Назначение	4
Краткое описание	5
Принцип проведения процедуры.....	5
Материалы, входящие в комплект поставки.....	7
Комплектация набора	7
Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки.....	7
Предупреждения и меры предосторожности	10
Информация по технике безопасности.....	10
Общие меры предосторожности	10
Меры предосторожности для профилей AssayManager.....	12
Хранение реагентов и обращение с ними	13
Обращение с образцами и их хранение	14
Подготовка образцов, хранящихся в среде PreservCyt	16
Подготовка образцов, хранящихся в среде SurePath™	19
Общие рекомендации по бисульфитному конвертированию	20
Протокол: ПЦР с использованием QIASure Methylation Test на приборе Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	21
Интерпретация результатов	35
Руководство по поиску и устранению неисправностей.....	40
Ограничения	43
Рабочие характеристики	45
Предел обнаружения (LOD).....	45

Линейность	45
Прецизионность.....	46
Интерферирующие вещества	47
Клиническая эффективность.....	47
Надежность.....	51
Литература	54
Символы.....	56
Контактная информация	57
Информация для заказа.....	58
История изменения документа	61

Назначение

QIASure Methylation Test (№ по кат. 616014) — это тест-система на основе мультиплексной специфичной к метилированию ПЦР в реальном времени для выявления гиперметилирования промоторов генов *FAM19A4* и *hsa-mir124-2*. С помощью QIASure Methylation Test можно проводить анализ бисульфит-конвертированной ДНК, выделенной из образцов, собранных следующими способами:

- цервикальных образцов, собранных с помощью *digene*® HC2 DNA Collection Device (собираются врачом);
- цервикальных образцов, собранных с помощью специального инструмента в виде щетки/метелки и помещенных в раствор PreservCyt® Solution или SurePath™ (собираются врачом);
- вагинальных образцов, собранных с помощью специального инструмента в виде щетки/метелки (собираются пациенткой самостоятельно).

Показания к применению:

1. Для анализа в порядке последующего наблюдения у женщин с положительным результатом анализа на вирус папилломы человека (ВПЧ) с целью определения необходимости направления на кольпоскопию или другие процедуры в рамках последующего наблюдения.
2. Для анализа в порядке последующего наблюдения у женщин, у которых в мазке по Папаниколау обнаружены атипичные клетки плоского эпителия неясного значения (*atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US*), с целью определения необходимости направления на кольпоскопию или другие процедуры в рамках последующего наблюдения.

Данный продукт рассчитан на применение профессиональными пользователями, например технологами и лаборантами, прошедшими надлежащую подготовку в области выполнения диагностических процедур *in vitro*, методик молекулярно-биологических исследований, а также использования системы Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Краткое описание

Метилирование ДНК — это биохимический процесс, важный для развития высших организмов (1). Он заключается в присоединении метильной группы в 5-ю позицию пиримидинового кольца нуклеотида цитозина. Кроме того, аномалии метилирования ДНК играют значительную роль в канцерогенезе. Гиперметилирование промоторов генов *FAM19A4* (семейство со сходством последовательностей 19 (хемокин (СС-мотив)-подобный), член A4) и/или *hsa-mir124-2* (*микро-РНК 124-2 homo sapiens*) выявлено при нескольких видах рака у человека и в ряде линий раковых клеток, в том числе при раке шейки матки и раке эндометрия (2–6). Анализ на метилирование промоторов в клетках-хозяевах позволяет прицельно выявлять определенные виды рака, а также очаги цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) на так называемых поздних стадиях, которые характеризуются ракоподобным профилем метилирования и высоким краткосрочным риском перехода в рак (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). Тест-система QIASure позволяет выявлять гиперметилирование промоторов генов *FAM19A4* и *hsa-mir124-2* на бисульфит-конвертированной ДНК, выделяемой из цервикальных или вагинальных образцов, используя АСТВ (ген бета-актина человека) как внутренний контроль качества пробы.

Принцип проведения процедуры

QIASure Methylation Test — это анализ на основе мультиплексной real-time PCR, предполагающий амплификацию метилированных участков промоторов генов — супрессоров опухолей *FAM19A4* и *hsa-mir124-2*, а также неспецифического к метилированию участка референсного гена. В набор входят 2 пробирки с QIASure Master Mix и 2 пробирки с QIASure Calibrator. Мастер-микс предназначен для амплификации бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из клинических образцов. Мастер-микс содержит праймеры и зонды для целевых генов и референсного гена, который служит внутренним контролем качества пробы. Калибратором служит линейаризованная плаزمиды, содержащая последовательности ампликонов *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* и АСТВ.

Порядок работы



Тест-система QIASure работает на приборе Rotor-Gene Q MDx, а анализ и интерпретация данных выполняются автоматически программой Rotor-Gene AssayManager®. Значение C_T (порог циклов) отражает количество циклов ПЦР, необходимое для распознавания флуоресцентного сигнала, превышающего фоновый сигнал, которое коррелирует с количеством целевых молекул в пробе. Тест-система QIASure рассчитывает значение ΔC_T как разность между значением C_T для целевого гена *FAM19A4* или *hsa-mir124-2* и значением C_T для референсного гена (АКТВ). Это значение ΔC_T является относительным количественным показателем уровня метилирования промоторов гена *FAM19A4* или *hsa-mir124-2*. Для нормализации значение ΔC_T для калибровочной пробы вычитается из ΔC_T для целевого гена *FAM19A4* или *hsa-mir124-2*, что дает значение $\Delta\Delta C_T$ (9). Калибратором служит проба стандартизированной плазмидной ДНК с малым количеством копий, содержащий известное количество копий трех объектов анализа (*FAM19A4*, *hsa-mir124-2* и АКТВ).

Материалы, входящие в комплект поставки

Комплектация набора

QIAzure Methylation Test		72
№ по каталогу		616014
Количество реакций		72
QIAzure Master Mix (2 пробирки)	Пробирка коричневого цвета	630 мкл
QIAzure Calibrator (2 пробирки)	Прозрачная пробирка	25 мкл
Инструкция по применению QIAzure Methylation Test (Руководство)		1

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

При работе с химическими веществами обязательно надевайте подходящие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

Расходные материалы и реагенты для подготовки проб, собранных самостоятельно

- Раствор Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Реагенты для подготовки образцов, помещенных в среду для сбора образцов SurePath.

- Buffer AL (№ по кат. QIAGEN: 19075)

Расходные материалы и реагенты для бисульфитного конвертирования

В состав верифицированных наборов для бисульфитного конвертирования входит следующее:

- EZ DNA Methylation Kit (ZYMO Research, № по кат. D5001 или № по кат. D5002)
- EZ DNA Methylation Lightning (ZYMO Research, № по кат. D5030 или № по кат. D5031)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, № по кат. 59720)
- QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN № по кат. 931106)

Расходные материалы для прибора Rotor-Gene Q MDx

- Стрипованные пробирки и колпачки Strip tubes and Caps, 0.1 mL (№ по кат. 981103)
- Очищенная вода (напр., предназначенная для молекулярно-биологических исследований, дистиллированная или деионизированная)

Оборудование

- Регулируемые пипетки*, предназначенные специально для ПЦР (1–10 мкл; 10–100 мкл)
- Одноразовые перчатки
- Настольная центрифуга* со скоростью вращения ротора >10 000 об/мин
- Вортекс-миксер*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, № по кат. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, № по кат. ND-3300) или аналог
- Система QIASymphony SP System (№ по кат. 9001297) для дополнительной автоматической выделения и/или для бисульфитного конвертирования

* Убедитесь, что приборы проверены и откалиброваны в соответствии с рекомендациями производителя.

Оборудование для real-time PCR

- Система Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (№ по кат. 9002033) или прибор Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (№ по кат. 9002032)*
- Программа Rotor-Gene AssayManager Core Application версии 1.0.x (где x больше либо равен 4)
- Установленный плагин Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in версии 1.0.x (где x больше либо равен 1)
- QIASure Assay Profile (из файла AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (где Y больше либо равен 1) для применения при работе с бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из цервикальных образцов, собранных врачом.
- Собранный самостоятельно вагинальный соскоб QIASure Assay Profile (из файла AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (где Y больше либо равен 0) для применения при работе с бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из вагинальных соскобов, собранных врачом.

* Прибор Rotor-Gene Q 5plex HRM с датой производства январь 2010 г. или более поздней. Дату производства можно определить по серийному номеру на задней стороне прибора. Серийный номер имеет формат «ммгг№№№№», где «мм» — цифровое обозначение месяца производства, «гг» — последние две цифры года производства, а «№№№№» — уникальный идентификатор прибора.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики in vitro.

Информация по технике безопасности

При работе с химическими веществами обязательно надевайте подходящие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Дополнительную информацию см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ). Для каждого набора QIAGEN® и каждого компонента набора их можно найти, просмотреть и распечатать в Интернете по адресу www.qiagen.com/safety, где они размещены в удобном и компактном формате PDF.

QIASURE MASTER MIX



Содержит 1,2,4-триазол: Опасно! Есть подозрение, что данное вещество может снизить фертильность или нанести вред нерожденному ребенку. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду и используйте средства защиты глаз/лица.

Общие меры предосторожности

Применение тест-систем для ПЦР требует соблюдения принципов надлежащей лабораторной практики, в том числе в отношении технического обслуживания оборудования, предусмотренных для молекулярной биологии и соответствующих действующим нормативным требованиям и стандартам.

Всегда уделяйте должное внимание следующему:

- Работайте с образцами в неопудренных одноразовых защитных перчатках, лабораторном халате и защитных очках.
- Не допускайте микробного и нуклеазного (ДНКазного) загрязнения образца и набора для анализа. Присутствие ДНКаз может привести к деградации матричной ДНК.
- Не допускайте загрязнения в результате следового переноса ДНК или продуктов ПЦР: это может привести к получению ложноположительного сигнала.
- Всегда используйте очищенные от ДНКаз одноразовые наконечники пипеток с аэрозольным барьером.
- Реагенты тест-системы QIASure разведены до оптимальной концентрации. Не разводите реактивы дополнительно: это может привести к ухудшению качества работы системы.
- Все реагенты, входящие в набор QIASure, предназначены для использования исключительно с другими реагентами в составе того же набора. Не заменяйте никакие реагенты набора такими же реагентами из другого набора QIASure, даже в пределах одной и той же партии. Это может привести к ухудшению качества работы системы.
- Дополнительные предупреждения, предостережения и инструкции см. в руководстве пользователя прибора Rotor-Gene Q MDx.
- Перед проведением первого за день цикла выполните 10-минутный цикл разогрева Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM при температуре 95 °C.
- Изменение времени и температур инкубации может привести к получению ошибочных или противоречивых данных.
- Не используйте компоненты набора, срок годности которых истек, а также компоненты, хранившиеся неправильно.
- Сводите к минимуму воздействие света на компоненты набора; оно может привести к изменению реакционных смесей.
- Соблюдайте крайнюю осторожность во избежание загрязнения смесей синтетическими материалами, содержащимися в реагентах ПЦР.
- Утилизируйте отходы проб и отходы тест-системы в соответствии с действующими в регионе требованиями безопасности.

Меры предосторожности для профилей AssayManager

Для разных типов проб требуются разные профили AssayManager. Убедитесь, что используемый профиль соответствует типу проб, которые планируется исследовать, как указано ниже:

- Профиль тест-системы QIASure cervical scrapes Assay Profile (из файла AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) необходимо использовать для анализа бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из цервикальных образцов, собранных врачом
- Профиль тест-системы QIASure self-collected brush specimens Assay Profile (из файла AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) необходимо использовать для анализа бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из вагинальных соскобов, собранных пациентками самостоятельно.

Хранение реагентов и обращение с ними

Условия транспортировки

QIASure Methylation Test поставляется на сухом льду. Если при получении QIASure Methylation Test какой-либо компонент не находится в замороженном состоянии, внешняя упаковка вскрывалась во время перевозки или к грузу не приложен упаковочный лист, руководство либо реагенты, обратитесь в одно из подразделений технической службы QIAGEN или к региональным дистрибьюторам (см. последнюю страницу обложки или зайдите на веб-сайт www.qiagen.com).

Условия хранения

Сразу после получения QIASure Methylation Test необходимо поместить на хранение в морозильную камеру с постоянной температурой от -15 до -30 °C и предохранять от воздействия света.

Стабильность

При хранении в указанных условиях QIASure Methylation Test сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке коробки.

После вскрытия реагенты можно хранить в оригинальной упаковке при температуре от -15 до -30 °C. Не следует допускать их оттаивания и повторной заморозки. Количество циклов заморозки и оттаивания не должно превышать 3.

- Осторожно перемешивайте содержимое пробирки, переворачивая ее 10 раз, и центрифугируйте все пробирки перед вскрытием.
- Срок годности каждого реагента указан на индивидуальной этикетке компонента набора. При хранении в надлежащих условиях продукт сохраняет рабочие характеристики в течение срока годности при условии использования компонентов из одной и той же партии.

Обращение с образцами и их хранение

ВНИМАНИЕ!



Со всеми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Цервикальные образцы

Набор QIASure предназначен для анализа проб бисульфит-конвертированной геномной ДНК, полученной из цервикальных образцов. Утвержденные среды для сбора цервикальных образцов (соскобов) — среда для сбора образцов PreservCyt®, среда для сбора образцов SurePath™ и транспортная среда для образцов *Digene Specimen Transport Medium (STM)*. Оптимальная температура хранения клинических проб после их поступления в лабораторию составляет 2–8 °С. При хранении в таких условиях пробы в среде для сбора образцов PreservCyt или SurePath™ сохраняют стабильность в течение 3 месяцев до выделения ДНК.

Примечание. Цервикальные пробы в STM можно перевозить при температуре 2–30 °С при ночной доставке в лабораторию, выполняющую анализ, и повторно замораживать при температуре –20 °С после получения.

Самостоятельно собранные вагинальные соскобы

QIASure Methylation Test предназначается для анализа проб бисульфит-конвертируемой геномной ДНК, выделенной из вагинальных соскобов, собранных пациентками самостоятельно. Самостоятельно собранные вагинальные соскобы можно хранить и транспортировать сухими и хранить в среде для сбора образцов PreservCyt до момента доставки в лабораторию в рекомендованном объеме для хранения 2-3 мл. Пробы в среде для сбора образцов PreservCyt можно хранить не более 3 месяцев при температуре 2–8 °С или при комнатной температуре.

Пробы геномной ДНК

После выделения геномной ДНК пробы ДНК можно хранить и транспортировать при температуре от -15 до -30 °C в течение не более 12 месяцев.

Подготовка образцов, хранящихся в среде PreservCyt

Тест-система QIAure Methylation Test утверждена для использования с целью анализа бисульфит-конвертированной геномной ДНК, полученной из цервикальных образцов. Бисульфитное конвертирование геномной ДНК можно выполнять:

- I) с предварительным выделением ДНК и контролем качества ДНК, или
- II) непосредственно на цервикальном образце с использованием набора EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, № по кат. 59720), или
- III) непосредственно на цервикальном образце с использованием набора QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN № по кат. 931106).

Наши рекомендации представлены далее.

- **I) Бисульфитное конвертирование с предварительным выделением ДНК и контролем качества ДНК**

Этот протокол предполагает выделение ДНК, измерение концентрации ДНК, а затем — аликвотирование оптимального объема элюата перед выполнением протокола бисульфитного конвертирования и верифицирован для EZ DNA Methylation™ -Kit (№ по кат. D5001) и EZ DNA Methylation-Lightning Kit (№ по кат. D5030) производства ZYMO Research. Мы рекомендуем применять следующие методы:

- **Выделение ДНК**
С QIAure Methylation Test совместимы стандартные наборы для выделения ДНК (напр., на основе колонок и магнитных шариков).
- **Измерение концентрации ДНК**
Перед бисульфитным конвертированием ДНК измерьте концентрацию ДНК. Для измерения концентрации ДНК подходят системы Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (обе — производства Thermo Fisher Scientific) или их аналоги.

- Аликвотирование элюата ДНК
Оптимальное исходное количество ДНК для бисульфитного конвертирования составляет от 100 нг до 2 мкг, причем рекомендуется использовать для конвертирования бисульфитом 200 нг. Если концентрация ДНК слишком низка для бисульфитного конвертирования, повторите процедуру выделения ДНК с большим исходным объемом клинической пробы или элюируйте ДНК меньшим объемом элюирующего раствора.
- Бисульфитное конвертирование с использованием EZ DNA Methylation Kit и EZ DNA Methylation-Lightning Kit выполняется согласно рекомендациям производителя.

Примечание. Применительно к EZ DNA Methylation Kit для обеспечения достаточно высокой эффективности конвертирования (>98 %) максимальное количество ДНК пробы не должно превышать 2 мкг.

- **II) Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальном образце с использованием набора EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit**

Метод бисульфитного конвертирования непосредственно на цервикальном образце, помещенном в PreservCyt® Solution, утвержден для EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit производства QIAGEN. Мы ссылаемся на *руководство EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion* для проб с высокой концентрацией ДНК (1 нг–2 мкг) в соответствии с рекомендацией производителя, за исключением следующих моментов:

- Этап 1 протокола. Возьмите 2,5 % цервикального образца в среде для сбора образцов PreservCyt® (т. е. 500 мкл из 20 мл) и осадите центрифугированием в течение 10 минут при ускорении не менее 3390 x g. Удалите супернатант в отходы, оставив клеточный осадок в не более чем 20 мкл среды для сбора образцов PreservCyt. Эту пробу клеточного осадка нужно использовать для реакции бисульфитного конвертирования. Перейдите к этапу 2 протокола производителя.
- Buffer BL: Не добавляйте РНК-носитель.
- При бисульфитном конвертировании ДНК для элюирования используется по 50 мкл буфера Buffer EB на каждую пробу.

- **III) Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальном образце с использованием набора QIAasymphony Bisulfite Kit**

Метод бисульфитного конвертирования непосредственно на цервикальном образце, помещенном в PreservCyt® Solution, утвержден для QIAasymphony Bisulfite Kit производства QIAGEN. **Мы ссылаемся на руководство QIAasymphony Bisulfite kit; исследование проводится в соответствии с рекомендациями производителя.**

- Возьмите 2,5 % цервикального образца в среде для сбора образцов PreservCyt® (т. е. 500 мкл из 20 мл) и осадите центрифугированием в течение 10 минут при ускорении не менее 3390 x g. Удалите супернатант в отходы, оставив клеточный осадок в не более чем 20 мкл остатка среды для сбора образцов PreservCyt.
- Проведите реакцию бисульфитного конвертирования в соответствии с протоколом «QIAasymphony SP protocol sheet – Bisulfite 140_HC_V», начиная со 2-го этапа, используйте при этом клеточный осадок вместо ДНК.
- По завершении реакции бисульфитного конвертирования запустите цикл SP на QIAasymphony, как описано в протоколе «Bisulfite conversion of unmethylated Cytosines in different sample types» (Бисульфитное конвертирование неметилированных цитозинов в образцах различных типов) в руководстве QIAasymphony Bisulfite Kit. Элюирование выполняется в 40 мкл.

Подготовка образцов, хранящихся в среде SurePath™

Образцы, хранящиеся в среде SurePath, требуют предварительной обработки перед выделением ДНК. Тест-система QIASure Methylation Test утверждена для использования с целью анализа бисульфит-конвертированной геномной ДНК, полученной из цервикальных образцов с использованием нижеописанной процедуры.

- Возьмите 2,5 % цервикального образца.
- Центрифугируйте в течение 10 минут при ускорении 4000 g, удалите супернатант, но оставьте 100 мкл среды SurePath™.
- Добавьте 100 мкл буфера Buffer AL и ресуспендируйте осадок.
- Хорошо перемешайте и инкубируйте в течение 20 минут при 90 °C.
- Охладите в течение 5 минут при комнатной температуре.
- Выполните выделение ДНК с помощью мини-набора QIAamp DNA mini kit (или аналога) в соответствии с инструкцией производителя, элюируйте ДНК в 50 мкл.
- Измерьте концентрацию ДНК, подходящие системы — Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (обе — производства Thermo Fisher Scientific) или их аналоги.
- Для бисульфитного конвертирования рекомендуется использовать 200 нг ДНК, если масса 200 нг не доступна, используйте максимально возможную. Выполните конвертирование с использованием EZ DNA Methylation Kit или EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo) в соответствии с инструкцией производителя. Используйте 2,5 мкл элюата для QIASure Methylation Test.

Общие рекомендации по бисульфитному конвертированию

Реакция бисульфитного конвертирования должна проводиться в специально отведенной для этого зоне, отделенной от места хранения и дозирования QIASure Master Mix, во избежание загрязнения реагентов.

Для реакции в QIASure требуется 2,5 мкл бисульфит-конвертированной ДНК.

Если для внутреннего контроля качества пробы получен отрицательный результат (т. е. значения C_t для АСТВ $>26,4$), это означает, что при приготовлении бисульфит-конвертированной ДНК образца получен материал в недостаточном количестве и/или неудовлетворительного качества и результат недействителен. Выполните рекомендованные действия, чтобы получить для АСТВ значение C_t , находящееся в допустимом диапазоне, для следующего:

- Бисульфитное конвертирование с предварительным выделением ДНК и контролем количества ДНК: Повторите реакцию бисульфитного конвертирования с большим исходным количеством ДНК пробы и/или повторите процедуру выделения ДНК с большим исходным количеством цервикального образца
- Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальном образце: Повторите реакцию бисульфитного конвертирования с 10 %* цервикального образца в среде для сбора образцов PreservCyt (т. е. 2 мл из 20 мл).

Бисульфит-конвертированную ДНК можно хранить не более 24 часов при температуре 2–8 °С, до 5 суток — при температуре от –15 до –25 °С и до 3 месяцев — при температуре ниже –70 °С. Повторного замораживания и оттаивания бисульфит-конвертированной ДНК не следует допускать при любых обстоятельствах. Для сохранения удовлетворительного качества проб количество циклов замораживания о оттаивания не должно превышать трех.

* Объем пробы для прямого бисульфитного конвертирования можно увеличить, если показатель успеха неудовлетворителен из-за вариабельности способа сбора проб, например в результате их неправильного сбора.

Протокол: ПЦР с использованием QIASure Methylation Test на приборе Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*

Важные замечания перед началом работы

- Внимательно ознакомьтесь с прибором Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, прежде чем начать выполнение протокола. См. руководство пользователя прибора (№ по кат. 9002033 или 9002032).
- Перед проведением первого за день цикла выполните 10-минутный цикл разогрева Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM при температуре 95 °C.
- Программа Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 обеспечивает автоматическую интерпретацию результатов ПЦР. Цикл с использованием набора QIASure выполняется на приборе Rotor-Gene Q MDx с применением Rotor-Gene AssayManager версии 1.0. Уделите время ознакомлению с программой Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 (№ по кат. 9022739) и плагином Epsilon Plug-In — см. соответствующие руководства пользователя.
- Для разных типов проб требуются разные профили тест-системы в Rotor-Gene AssayManager версии 1.0. Убедитесь, что используемый профиль соответствует типу проб, которые планируется исследовать, как указано ниже:
 - Профиль тест-системы QIASure cervical scrapes Assay Profile (из файла AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) необходимо использовать для анализа бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из цервикальных образцов, собранных врачом

* Прибор Rotor-Gene Q 5plex HRM с датой производства январь 2010 г. или более поздней. Дату производства можно определить по серийному номеру на задней стороне прибора. Серийный номер имеет формат «ммгг№№№№», где «мм» — цифровое обозначение месяца производства, «гг» — последние две цифры года производства, а «№№№№» — уникальный идентификатор прибора.

- Профиль тест-системы QIASure self-collected brush specimens Assay Profile (из файла AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) необходимо использовать для анализа бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из собранных самостоятельно вагинальных соскобов.

Примечание. В рамках одной процедуры анализа можно исследовать пробы только одного типа. Для каждого типа проб предусмотрены свои оптимальные профили тест-систем, и пользователь должен правильно выбирать такой профиль чтобы получать оптимальные результаты для каждого типа проб.

Необходимые действия перед началом процедуры

- Необходимо установить на компьютер, подключенный к Rotor-Gene Q MDx, программу Rotor-Gene AssayManager версии 1.0.x (где x больше либо равен 4). Подробнее об установке Rotor-Gene AssayManager Core Application версии 1.0 см. в *Руководстве пользователя Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application*.
- Для работы с QIASure Methylation Test требуется специальный плагин под названием «Epsilon Plug-in» (версии 1.0.1 или более поздних версий). Этот плагин можно загрузить на веб-странице QIAGEN:
<http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Его необходимо установить на компьютер, на котором уже установлена программа Rotor-Gene AssayManager версии 1.0.x (где x больше либо равен 4).
- Для работы с QIASure Methylation Test требуется определенный профиль тест-системы, запускаемый с программой Rotor-Gene AssayManager версии 1.0. Этот профиль тест-системы содержит все параметры, необходимые для циклирования и анализа полученных результатов. Предусмотрено 2 профиля QIASure Assay Profile.
 - Собранные врачом цервикальные соскобы QIASure Assay Profile (из файла AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) предназначен для анализа цервикальных образцов, собранных врачом.

- Собранный самостоятельно вагинальный соскоб QIASure Assay Profile (из файла AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) предназначен для анализа собранных самостоятельно вагинальных соскобов. Эти профили можно загрузить на веб-странице QIASure Methylation Test:

<http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Профиль тест-системы необходимо импортировать в программу Rotor-Gene AssayManager.

Примечание. Анализ с использованием набора QIASure можно проводить, только если в программе Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 заданы определенные настройки конфигурации.

Для обеспечения безопасности выполнения процессов на системном уровне необходимо задать следующие обязательные настройки конфигурации для режима Closed (Закрытый):

- Material number required (Необходим номер материала)
- Valid expiry date required (Необходим допустимый срок годности)
- Lot number required (Необходим номер партии)

Установка плагина Epsilon Plug-in и импорт профиля тест-системы

Подробную информацию об установке и импорте плагина Epsilon Plug-in и профиля тест-системы см. в *руководстве пользователя Rotor-Gene AssayManager Core Application* и *руководстве пользователя Epsilon Plug-In*.

- Загрузите плагин Epsilon Plug-in и последнюю версию профиль тест-системы QIASure Assay Profile на веб-сайте QIAGEN.
- Запустите процедуру установки двойным щелчком мыши на файле **EpsilonPlugIn.Installation.msi**, после чего следуйте инструкциям по **установке**. Подробное описание этой процедуры см. в разделе «Установка плагинов» в *Руководстве пользователя AssayManager Core Application*.

Примечание. Для обеспечения безопасности выполнения процессов на системном уровне выберите вкладку **Settings** (Настройки) и установите метки в полях **Material number required** (Необходим номер материала), **Valid expiry date required** (Необходим допустимый срок годности) и **Lot number required** (Необходим номер партии) для режима Closed (Закрытый) (раздел Work list (Рабочий список)). Если эти опции не включены (метки в соответствующих полях отсутствуют), включите их щелчком мыши.

- После успешной установки плагина пользователь с правами администратора для программы Rotor Gene AssayManager должен импортировать профиль тест-системы AP_QIASure_V1_0_Y.iar следующим образом:

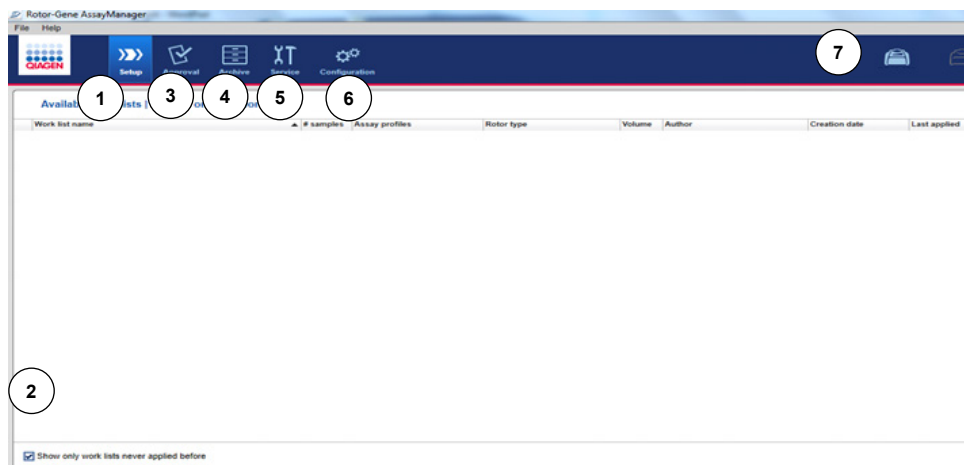
1. Откройте программу Rotor-Gene AssayManager, щелкнув мышью по ее

пиктограмме.  Откроется окно Rotor-Gene AssayManager (см. Рис. 1).



Рис. 1. Экран входа в систему Rotor-Gene AssayManager

2. Войдите в Rotor-Gene AssayManager со своим именем пользователя и паролем. Не меняйте режим «Closed» (Закрытый). Нажмите **ОК**. Откроется экран Rotor-Gene AssayManager (см. далее).



1 Вкладка **Set-up** (Настройка). На этой вкладке осуществляется управление рабочими списками и их применение.

2 При установке метки в поле опции примененных рабочих список здесь отображаются только новые рабочие списки.

3 Вкладка Approval (Утверждение). На этой вкладке можно найти предыдущие процедуры анализа (циклы).

4 Вкладка Archive (Архив). Здесь можно найти предыдущие процедуры анализа (циклы), которые уже были утверждены.

5 Вкладка Service (Сервис). Здесь отображается журнал событий для каждого файла, генерируемый программой.

6 Вкладка Configuration (Конфигурация). Предназначена для настройки конфигурации всех параметров программы

7 Пиктограммы Rotor-Gene Q MDx.

 Не подключен  Подключен

3. Выберите среду Configuration (Конфигурация).

4. Выберите вкладку **Assay Profiles** (Профили тест-систем).

5. Нажмите **Import** (Импорт).

6. Выберите профиль тест-системы AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iar для цервикальных образцов и/или профиль тест-системы AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iar, который нужно импортировать, в диалоговом окне и нажмите **Open** (Открыть).

7. Когда профиль тест-системы будет успешно импортирован, его можно будет использовать в среде Setup (Настройка).

Примечание. Одну и ту же версию профиля тест-системы нельзя импортировать дважды.

Обработка образцов на приборах Rotor-Gene Q MDx с ротором на 72 пробирки

В рамках одной процедуры анализа (цикла) можно провести анализ до 70 проб бисульфит-конвертированной ДНК, помимо калибратора и контроля без матрицы. На схеме в Таблице 1 представлен пример загрузочного блока или загрузки ротора для процедуры анализа с QIASure Methylation Test. Числами обозначены положения на загрузочном блоке, а также конечные положения для ротора.

Таблица 1. Подготовка планшета и ротора для процедуры анализа с использованием набора QIASure на приборе Rotor-Gene Q MDx

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



ВНИМАНИЕ! Пробирки необходимо вставлять в ротор, как показано в Таблице 1. Автоматизированная процедура анализа, запрограммированная в профиле тест-системы, основана на этой схеме. Использование другой схемы приведет к искажению результатов анализа.

Примечание. Заполните все неиспользуемые позиции пустыми пробирками.

ПЦР на приборах Rotor-Gene Q MDx с ротором на 72 пробирки

Перед проведением первого за день цикла выполните 10-минутный цикл разогрева Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM при температуре 95 °C.

1. Создайте рабочий список для исследуемой пробы следующим образом:

- 1a. Включите прибор Rotor-Gene Q MDx.
- 1b. Откройте программу Rotor-Gene AssayManager и войдите в нее как пользователь с правами оператора в режиме Closed (Закрытый).
- 1c. Нажмите кнопку **New Work List** (Новый рабочий список) в диспетчере рабочих списков (среда «Setup» (Настройка)).
- 1d. Выберите **QIASure Assay Profile** в списке доступных профилей тест-систем.

Примечание. Профиль тест-системы

AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iar предназначен для цервикальных образцов, профиль тест-системы AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iar предназначен для вагинальных соскобов, собранных самостоятельно.

Примечание. В рамках одной процедуры анализа можно исследовать пробы только одного типа.

- 1e. Нажмите Move (Переместить), чтобы переместить выбранный профиль тест-системы в список **Selected assay profiles (Выбранные профили тест-системы)**. После этого профиль тест-системы должен отобразиться в списке «Selected assay profiles» (Выбранные профили тест-системы).
- 1f. Введите значение количества проб в соответствующее поле.
- 1g. Введите указанные ниже сведения о наборе QIASure, которые напечатаны на крышке коробки.
 - Material number (Номер материала): 1102417
 - Valid expiry date using the format YYYY-MM-DD (Допустимый срок годности в формате ГГГГ-ММ-ДД)
 - Номер партии

- 1h. Выберите этап **Samples** (Пробы). На экране AssayManager отобразится список со сведениями о пробах. Этот список отражает ожидаемое расположение проб на роторе.
- 1i. Внесите в этот список идентификационный номер (идентификационные номера) пробы (проб), а также всю дополнительную информацию о пробах в виде комментария для каждой пробы.
- 1j. Выберите этап **Properties** (Свойства) и введите имя рабочего списка (Рис. 2).

Рис. 2. Properties (Свойства)

- 1k. Подтвердите введенные данные, установив метку в поле **Is applicable** (Применимо) и нажмите **Apply** (Применить).
- 1l. Сохраните рабочий список.
Рабочий список можно напечатать, что может пригодиться при подготовке и постановке ПЦР. Чтобы напечатать рабочий список, нажмите кнопку **Print work list** (Печать рабочего списка). В рабочий список включаются сведения о пробах.

Примечание. Рабочий список можно создать после настройки процедуры анализа на приборе или сохранить до установки проб в прибор.

2. Выполните постановку процедуры анализа QIASure.

Для сведения к минимуму риска загрязнения реагентов ПЦР настоятельно рекомендуется использовать бокс для ПЦР с возможностью УФ-облучения.

Внесение QIASure Master Mix должно осуществляться в зоне, отделенной от зоны, где проводится реакция бисульфитного конвертирования ДНК.

Перед началом работы очистите зону рабочего стола, пипетки и штатив для пробирок ДНК-деградирующим раствором во избежание загрязнения матрицей или нуклеазами.

Примечание. Заменяйте наконечники перед переходом к каждой следующей пробирке во избежание загрязнения какой-либо неспецифической матрицей или реакционной смесью, которое может привести к получению ложноположительных результатов.

2a. Полностью разморозьте QIASure Master Mix и QIASure Calibrator и по возможности предохраняйте QIASure Master Mix от воздействия света.

Примечание. Продолжительность этапа разморозки не должна превышать 30 минут в избежание деградации материала.

2b. Осторожно перемешайте содержимое, перевернув пробирку 10 раз, а затем кратковременно центрифугируйте перед использованием.

2c. Внесите 17,5 мкл готового к использованию QIASure Master Mix в надлежащие стрипованные пробирки. Постановка реакции возможна при комнатной температуре.

2d. Снова поместите QIASure Master Mix в морозильную камеру в избежание деградации материала.

2e. Переместите пробирки в отдельную зону для внесения контролей тест-системы и проб бисульфит-конвертированной ДНК.

2f. Добавьте 2,5 мкл воды в пробирку для контроля без матрицы (**No Template Control, NTC**) в положении 2 (см. Таблицу 1 ранее). Осторожно перемешайте содержимое путем набора и выпуска пипеткой.

2g. Внесите 2,5 мкл QIASure Calibrator в пробирку в положении 1 (см. Таблицу 1 ранее). Осторожно перемешайте содержимое путем набора и выпуска пипеткой и закройте пробирку колпачком.

2h. Внесите 2,5 мкл бисульфит-конвертированной ДНК в соответствующую пробирку. Осторожно перемешайте содержимое путем набора и выпуска пипеткой.

2i. После заполнения набора из 4 пробирок закройте пробирки колпачками.

Примечание. Пробирки для ПЦР можно хранить в течение 30 минут между внесением в них проб пипеткой и началом процедуры анализа на приборе, который должен выполняться при температуре 2–8 °C, в темноте.

2j. Снова поместите QIASure Calibrator в морозильную камеру в избежание деградации материала.

Примечание. Заменяйте наконечники перед переходом к каждой следующей пробирке во избежание загрязнения какой-либо неспецифической матрицей или реакционной смесью, которое может привести к получению ложноположительных результатов.

3. Подготовьте прибор Rotor-Gene Q MDx и запустите цикл (процедуру анализа) следующим образом:

3a. Поместите 72-луночный ротор 72-Well Rotor на держатель для ротора Rotor Holder.

3b. Заполните ротор стрипованными пробирками, поместив их в назначенные места, начиная с позиции 1, как показано в Таблице 1. Неиспользуемые позиции заполните закрытыми пустыми стрипованными пробирками.

Примечание. Убедитесь, что первая пробирка установлена в положение 1 и что все стрипованные пробирки установлены с правильной ориентацией в свои положения, как показано в Таблице 1.

3c. Прикрепите предохранительное кольцо.

3d. Установите ротор с предохранительным кольцом в прибор Rotor-Gene Q MDx и закройте крышку прибора.

3e. В программе Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 либо выберите нужный рабочий список в диспетчере рабочих списков и нажмите **Apply** (Применить), либо, если рабочий список все еще открыт, нажмите **Apply** (Применить).

Примечание. Если рабочий список для цикла еще не создан, войдите в программу Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 и выполните этап 1, прежде чем продолжить.

3f. Введите имя цикла (процедуры анализа).

3g. Выберите нужный циклер в списке **Cycler selection (Выбор циклера)**.

- 3h. Проверьте правильность крепления предохранительного кольца и подтвердите на экране, что предохранительное кольцо прикреплено.
- 3i. Нажмите **Start experiment** (Начать процедуру анализа).
После этого должен начаться цикл работы QIASure Methylation Test.
4. По завершении цикла нажмите **Finish run** (Завершить цикл).
5. Выполните выгрузку и утвердите цикл.
- Для пользователей, зарегистрированных в системе с правами Approver (Утверждающий): нажмите **Release and go to approval** (Выгрузить и перейти к утверждению).
 - Для пользователей, зарегистрированных в системе с правами Operator (Оператор): нажмите Release (Выгрузить).
6. Выгрузите результаты.
- Если была нажата кнопка **Release and go to approval** (Выгрузить и перейти к утверждению), отобразятся результаты анализа.
 - Если пользователем с правами оператора была нажата кнопка Release (Выгрузить), то потребуется вход в систему пользователя с правами Approver (Утверждающий), который должен будет выбрать среду Approval (Утверждение).
 - Отфильтруйте результаты тест-системы, которые нужно утвердить, задав параметры фильтрации списка и нажав Apply (Применить).
 - Просмотрите результаты и утвердите результаты для каждой исследуемой пробы.

В таблице Results (Результаты) прокрутите страницу до пробы, результат для которой требуется утвердить. Для каждого результата анализа пробы, который подлежит утверждению, имеется три кнопки с зависимой фиксацией в конце соответствующей строки.

Примите либо отклоните результат для пробы.

Примечание. Результат, автоматически обозначенный как **INVALID** (Недействительно) программой Rotor-Gene AssayManager, больше не может быть преобразован в действительный результат, даже в случае отклонения.

Необязательно: Введите комментарий в столбец Sample comment (Комментарий к пробе).

- Нажмите **Release/Report data (Выгрузить/Выдать отчет)**.
- Нажмите **ОК**. Отчет будет сформирован в формате Adobe Portable Document (.pdf) и автоматически сохранен в предварительно заданной папке. Путь к этой папке по умолчанию следующий: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports** (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Экспорт > Отчеты)

Примечание. Эти путь и папку можно сменить в среде «Configuration» (Конфигурация).

- Перейдите на вкладку Archive (Архив), чтобы экспортировать файл .rex, соответствующий необработанным данным. Найдите нужную процедуру анализа, воспользовавшись опциями фильтрации, и нажмите **Show assays (Показать тест-системы)**. Затем нажмите на экспортируемый файл .rex и сохраните его нажатием кнопки **ОК**. Программа автоматически сохранит файл .rex в следующей предварительно заданной папке: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments** (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Экспорт > Эксперименты)

Примечание. Эти путь и папку можно сменить на вкладке **Specify the .rex file export destination** (Укажите путь экспорта файла .rex).

Примечание. Для поиска и устранения неисправностей необходим пакет поддержки для цикла. Пакеты поддержки формируются в среде Approval (Утверждение) или Archive (Архив). См. *руководство пользователя Rotor-Gene AssayManager Core Application*, раздел «Поиск и устранение неисправностей», параграф «Создание пакета поддержки» на веб-сайте по адресу:

<https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Кроме того, могут пригодиться данные журнала событий на момент возникновения проблемы ± 1 день. Журнал событий можно получить в среде Service (Сервис) (*руководство пользователя Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Разгрузите прибор Rotor- Gene Q MDx и удалите стрипованные пробирки в отходы в соответствии с действующими в регионе требованиями к безопасности.

Интерпретация результатов

Процедура анализа полностью автоматизирована.

Программа Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 сначала анализирует кривые амплификации и может признать недействительными кривые, не соответствующие необходимым параметрам, исходя из их формы и амплитуды помех. В этом случае кривая, признанная недействительной, снабжается соответствующей меткой (см. Таблицу 2).

Затем программа Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 анализирует контроли цикла.

- Калибратор
- NTC

Примечание. В отчете, который генерируется в конце цикла, отображаются результаты, полученные для контролей цикла, и для недействительных данных отображаются соответствующие метки.

Если все контроли цикла соответствуют необходимым параметрам, то Rotor-Gene AssayManager выполняет анализ проб, состав которых неизвестен.

В Таблице 2 показаны метки недействительного результата для пробы, которыми могут снабжаться результаты для отдельных пробирок при анализе с помощью Rotor-Gene AssayManager версии 1.0, с пояснениями к каждой метке.

Таблица 2. Метки недействительного результата для пробы и пояснения к терминам

Метка	Поведение	Описание
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Недействительно)	Целевое значение превышает заданный диапазон. Это может быть значение C_T , значение флуоресценции в конечной точке, значение концентрации или рассчитанное значение, например среднее C_T или ΔC_T .
ASSAY_INVALID	Invalid (Недействительно)	Результат тест-системы недействителен, поскольку недействителен результат как минимум для одного внешнего контроля.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Недействительно)	Целевое значение ниже заданного диапазона. Это может быть значение C_T , значение флуоресценции в конечной точке, значение концентрации или рассчитанное значение, например среднее C_T или ΔC_T .
CONSECUTIVE_FAULT	Invalid (Недействительно)	Целевое значение, используемое для расчета этого целевого значения, недопустимо.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Invalid (Недействительно)	Кривая амплификации для необработанных данных имеет форму, которая отклоняется от картины, характерной для данной тест-системы. Высока вероятность получения неверных результатов или неправильной интерпретации результатов.
FLAT_BUMP	Invalid (Недействительно)	На кривой амплификации для необработанных данных присутствует плоский пик, не соответствующий картине, характерной для данной тест-системы. Высока вероятность получения неверных результатов или неправильной интерпретации результатов (например, неправильного определения значения C_T).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Действительно)	Для NTC (контроль без матрицы, No Template Control) отображаются значения C_T сигнала выше 36 для целевого показателя ACTB.
INVALID_CALCULATION	Invalid (Недействительно)	При расчете данного целевого показателя произошел сбой.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Invalid (Недействительно)	Кривая амплификации пересекает порог более одного раза. Невозможно однозначно определить C_T .
NO_BASELINE	Invalid (Недействительно)	Начальное значение для исходного базового уровня не найдено.

Таблица 2. Метки недействительного результата для пробы и пояснения к терминам

NO_CT_DETECTED	Variable (Вариабельно)	Для данного целевого показателя не получено значение C _T .
NO_VALUE	Invalid (Недействительно)	Для целевого показателя отсутствует значение, однако ожидается, что оно должно быть. Данное значение не должно укладываться в определенный диапазон. Это может быть значение C _T , значение флуоресценции в конечной точке, значение концентрации или рассчитанное значение (например, среднее C _T или ΔC _T).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Warning (Осторожно!)	Отклонение во время процедуры нормализации. Кривая амплификации отображается с нормализацией по умолчанию, необходимо проверить правильность результатов вручную.
OTHER_TARGET_INVALID	Invalid (Недействительно)	Другой целевой показатель для той же пробы недействителен.
SATURATION	Invalid (Недействительно)	Сильное насыщение флуоресценции для необработанных данных до точки перегиба кривой амплификации.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warning (Осторожно!)	Насыщение флуоресценции для необработанных данных на участке плато кривой амплификации.
SPIKE	Warning (Осторожно!)	На кривой амплификации обнаружен пик флуоресценции для необработанных данных вне участка, на котором определяется C _T .
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Invalid (Недействительно)	На кривой амплификации обнаружен пик вблизи C _T .
STEEP_BASELINE	Invalid (Недействительно)	На кривой амплификации обнаружен крутой подъем базового уровня флуоресценции для необработанных данных.
STRONG_BASELINE_DIP	Invalid (Недействительно)	На кривой амплификации обнаружено сильное падение базового уровня флуоресценции для необработанных данных.
STRONG_NOISE	Invalid (Недействительно)	Зафиксированы сильные помехи вне фазы подъема кривой амплификации.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Invalid (Недействительно)	Зафиксированы сильные помехи в фазе подъема (экспоненциального роста) кривой амплификации.
UNCERTAIN	Variable (Вариабельно)	Результаты, полученные при AUDAS (автоматическое сканирование данных, Automatic Data Scan), противоречат результатам основного анализа.

Таблица 2. Метки недействительного результата для пробы и пояснения к терминам

Непротиворечивая автоматическая оценка достоверности данных невозможна.		
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable (Вариабельно)	Получено значение C _T для объекта анализа, который не должен амплифицироваться.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Недействительно)	Для целевого показателя получено значение, однако это значение отлично от ожидаемого. Это может быть значение C _T , значение флуоресценции в конечной точке, значение концентрации или рассчитанное значение, например среднее C _T или ΔC _T .
UPSTREAM	Variable (Вариабельно)	Пробе присвоен статус Invalid (Недействительно) или Unclear (Неясно) вышестоящим процессом (напр., QIAsymphony). Примечание. Поведение Rotor-Gene AssayManager в отношении проб, результаты которых помечены как неясные, задается в среде «Configuration» (Конфигурация) программы AssayManager. Установка меток «Invalid» (Недействительно) вышестоящими процессами всегда ведет к признанию недействительным результата для соответствующей пробы в Rotor-Gene AssayManager.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Invalid (Недействительно)	На кривой амплификации выявлена волнистость базового уровня флуоресценции для необработанных данных.

- Если результаты для всех контролей цикла действительны, то Rotor-Gene AssayManager версии 1.0 выполняет анализ проб, состав которых неизвестен. Для интерпретации результатов необходимо, чтобы в пробе присутствовало минимальное количество бисульфит-конвертированной ДНК. Это отражает значение C_T конститутивного гена ACTB, которое должно быть ≤26,4, для того чтобы проба была валидирована программой Rotor-Gene AssayManager.
- После этого рассчитываются значения ΔΔC_T для *FAM19A4* и *hsa-mir124-2* и выдается результат. Если значение ΔΔC_T ниже порога, то для объекта анализа фиксируется результат Hypermethylation positive (Положителен по гиперметилованию).

Примечание. Частичное или низкое метилирование является обычным явлением и, в отличие от уровня гиперметилирования, не связано напрямую с развитием рака.

- Проба считается Hypermethylation positive (Положителен по гиперметилированию), если результат Hypermethylation positive (Положителен по гиперметилированию) фиксируется хотя бы для одного из объектов анализа.
- Для проб с низким качеством/малым количеством ДНК (напр., если значения C_t для АСТВ едва соответствуют критерию приемлемости; если значения C_t составляют от 25 до 26,4) могут быть получены ложноотрицательные результаты. Рекомендуются повторный анализ ПЦР в одной повторности. Получение отрицательного результата при повторном анализе означает, что проба отрицательна по гиперметилированию, а получение положительного результата в этом случае означает, что проба положительна по гиперметилированию.
- При обработке образцов с высоким объемом клеточного содержимого с использованием протокола прямого конвертирования существует риск введения избыточного для ПЦР количества ДНК, что может привести к получению ложноотрицательного результата для мишени FAM19A4. Поэтому для образцов с 1) отрицательным результатом гиперметилирования, 2) значением C_t АСТВ ≤ 23 и 3) значением $\Delta\Delta C_t$ FAM19A4 10,36–11,36 рекомендуется проводить ПЦР с пятикратно меньшим объемом вводимой пробы или с конвертированной ДНК при разведении образца водой.

Руководство по поиску и устранению неисправностей

Данное руководство по устранению неполадок может быть полезным в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Подробнее см. на странице «Frequently Asked Questions» (Часто задаваемые вопросы) сайта нашего центра технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Научные специалисты технической службы QIAGEN всегда готовы ответить на любые ваши вопросы, касающиеся как информации, содержащейся в настоящем руководстве, в том числе о протоколах, так и методик работы с пробами и тест-системами (контактную информацию см. на последней странице обложки или на веб-сайте www.qiagen.com).

Информацию о поиске и устранении неисправностей применительно к Rotor-Gene AssayManager см. в *руководстве пользователя Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Комментарии и рекомендации

Общие принципы работы	
Концентрация ДНК в пробе слишком низка для бисульфитного конвертирования	
Проверьте экстракт ДНК	Повторите процедуру выделения ДНК, используя более концентрированную клиническую пробу
Результат для пробы признан недействительным: амплификация АСТВ слишком низкая либо отсутствует	
а) Ошибка пипетирования или отсутствие каких-либо реагентов	Проверьте методику пипетирования и постановку реакции. Повторите цикл ПЦР.
б) Проверьте концентрат ДНК	Увеличьте исходное количество ДНК для бисульфитного конвертирования до максимума. Реакция бисульфитного конвертирования максимально эффективна при исходном количестве ДНК от 100 нг до 2 мкг.

Комментарии и рекомендации

с) Для протокола «Bisulfite-conversion directly on cervical specimen» (Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальном образце) проверьте клинический образец на предмет объема клеточного содержимого	Повторите реакцию бисульфитного конвертирования с 10 % цервикального образца в среде для сбора образцов PreservCyt (т. е. 2 мл из 20 мл).
д) Проверьте бисульфит-конвертированный элюат	Повторите бисульфитное конвертирование. При необходимости можно использовать большее исходное количество ДНК.

Результат для пробы признан недействительным: получены недействительные результаты для FAM19A4 или hsa-mir124-2.

Недостаточное перемешивание	Перемешайте пробу и реакционную смесь пипетированием (приблизительно 10 раз на каждую пробирку). Повторите анализ пробы.
-----------------------------	--

Результат для положительного контроля признан недействительным: амплификация слишком низкая либо отсутствует для одного или более объектов анализа

а) Ошибка пипетирования или отсутствие каких-либо реагентов	Проверьте методику пипетирования и постановку реакции. Повторите цикл ПЦР.
б) Частичная деградация	Храните набор при температуре от -30 до -15 °C. Не допускайте более трех циклов повторного замораживания и оттаивания.
с) Частичная деградация реагентов ПЦР	Храните компоненты набора при температуре от -30 до -15 °C и защищайте реакционные смеси от воздействия света. Не допускайте повторного замораживания и оттаивания компонентов.
д) Переворачивание стрипованной пробирки	Проверьте методику пипетирования и постановку реакции.
е) Срок годности	Проверьте срок годности используемого набора.
ф) Задержка между пипетированием проб и запуском цикла	Реакционные смеси для ПЦР можно хранить при температуре 2–8 °C в течение 30 минут в темном месте между операциями внесения проб в реакционные смеси для ПЦР и запуска цикла на приборе.

Контроль без матрицы (No template control, NTC) непригоден

а) Ошибка пипетирования	Проверьте методику пипетирования и постановку реакции. Повторите цикл ПЦР.
б) Перекрестное загрязнение	Замените все наиболее важные реагенты. При работе с пробами, компонентами набора и расходными материалами всегда соблюдайте общепринятые правила во избежание загрязнения в результате следового переноса.

Комментарии и рекомендации

с) Загрязнение реагентов	Замените все наиболее важные реагенты. При работе с пробами, компонентами набора и расходными материалами всегда соблюдайте общепринятые правила во избежание загрязнения в результате следового переноса.
д) Переворачивание стрипованной пробирки	Проверьте методику пипетирования и постановку реакции.
е) Задержка между пипетированием проб и запуском цикла	Реакционные смеси для ПЦР можно хранить при температуре 2–8 °С в течение 30 минут в темном месте между операциями внесения проб в реакционные смеси для ПЦР и запуска цикла на приборе.
ф) Деградация зонда	Защищайте реакционные смеси от воздействия света. Проверяйте кривую флуоресценции на предмет наличия ложноположительных результатов.

Отсутствие сигнала либо слишком слабый сигнал для пробы при успешном выполнении цикла с контролем

а) Ингибирующее действие	Всегда убеждайтесь в отсутствии остатков буфера на фильтре после центрифугирования во время бисульфитного конвертирования. Повторите бисульфитное конвертирование.
б) Ошибка при пипетировании	Проверьте методику пипетирования и постановку реакции. Повторите цикл ПЦР.

Если проблема сохраняется, обратитесь в Техническую службу QIAGEN.

Ограничения

Реагенты QIASure Methylation Test разрешается использовать только для диагностики *in vitro*.

Применение тест-систем для ПЦР требует соблюдения принципов надлежащей лабораторной практики, в том числе в отношении технического обслуживания оборудования, предусмотренных для молекулярной биологии и соответствующих действующим нормативным требованиям и стандартам.

Реагенты и инструкции, прилагаемые к данному набору, утверждены как оптимальные с точки зрения эффективности работы.

Тест-система QIASure Methylation Test предназначена для применения профессиональными пользователями, обученными работе с приборами Rotor-Gene Q MDx и программой Rotor-Gene AssayManager версии 1.0.

Данный продукт должен использоваться только персоналом, прошедшим специальное обучение методикам постановки *real-time* PCR и методикам выполнения диагностических исследований *in vitro*. Все полученные диагностические результаты должны интерпретироваться с учетом других результатов клинического обследования и лабораторных анализов.

Для получения оптимальных результатов ПЦР необходимо строго соблюдать указания инструкции по применению (руководства).

Следует соблюдать сроки годности, указанные на коробке и на этикетках всех компонентов. Не используйте компоненты с истекшим сроком годности.

Для проб с низким качеством/малым количеством ДНК (напр., если значения C_t для АСТВ едва соответствуют критерию приемлемости; если значения C_t составляют от 25 до 26,4) могут быть получены ложноотрицательные результаты. Рекомендуется повторный анализ в одной повторности. Получение отрицательного результата при повторном анализе означает, что проба отрицательна по гиперметилированию, а получение положительного результата в этом случае означает, что проба положительна по гиперметилированию.

Все реагенты, входящие в комплект поставки QIASure Methylation Test, предназначены для использования исключительно с другими реагентами в составе того же набора. Несоблюдение этого условия может привести к ухудшению качества работы системы.

Тест-система QIASure Methylation Test допущена к применению у ВИЧ-положительных женщин.

Тест-система QIASure Methylation Test допущена к применению для анализа цервикальных образцов, собранных и сохраненных в среде для сбора образцов PreservCyt, SurePath™ или STM, а также собранных самостоятельно вагинальных соскобов, помещенных в среду PreservCyt по прибытии в лабораторию.

К применению в сочетании с тест-системой для ПЦР-анализа QIASure Methylation Test допущен только прибор Rotor-Gene Q MDx.

Любое использование данного продукта не в соответствии с инструкцией и/или внесение изменений в его компоненты влечет за собой освобождение компании Self-screen B.V. от обязательств в отношении него.

Пользователь отвечает за проверку качества работы системы при выполнении любых проводимых в его лаборатории процедур, не охваченных проведенными внутренними скрининговыми исследованиями качества работы системы.

Рабочие характеристики

Предел обнаружения (LOD)

Аналитическая чувствительность QIASure Methylation Test определялась как предел обнаружения 95 % (LOD 95 %) с использованием серии разведений плазмиды, содержащей все три последовательности ампликона (т. е. *ACTB*, *FAM19A4*, и *hsa-mir124-2*; в диапазоне от 750 000 до 0,25 копии на одну ПЦР). 95 % LOD для объектов анализа определялся как наименьшее разведение плазмиды, дающее положительные результаты минимум в 35 из 36 случаев ($C_T < 40$). Всего было проведено 12 опытов четырьмя операторами (1 цикл на оператора в день) в использовании трех партий продукта и трех разных систем RGQ. В рамках каждого опыта выполнялся анализ 11 разведений плазмиды в трех повторностях. 95 % LOD для всех трех объектов анализа составил 7,5 копий на одну ПЦР.

Линейность

Линейность для тест-системы QIASure определялась по данным 12 опытов, которые проводились для определения 95 % LOD. Для двух объектов анализа, *FAM19A4* и *hsa-mir124-2*, а также референсного гена *ACTB* была зафиксирована линейная амплификация в диапазоне от 750 000 до 7,5 копии на одну ПЦР.

Прецизионность

Прецизионность QIASure Methylation Test определялась как вариативность результатов внутри одной тест-системы (вариативность по нескольким результатам анализа проб одинаковой концентрации в рамках одного опыта) и общая вариативность результатов анализа с использованием тест-системы (вариативность по нескольким результатам анализа с использованием тест-системы, полученным разными операторами на разных приборах с использованием разных партий продукта, в разных лабораториях). Анализ проводился на бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из цервикального образца, положительного по ВПЧ (вирус папилломы человека) высокого риска, для которого был получен положительный результат по гиперметилированию с сигналами как для *FAM19A4*, так и для *hsa-mir124-2* и концентрация аналитов в котором превышала концентрацию LOD приблизительно в 3 раза. Анализ проводился в двух повторностях в 8 циклах четырьмя операторами (один цикл на оператора в день) с использованием двух разных партий продукта и трех разных приборов RGQ, в двух лабораториях, что позволило получить 16 результатов для каждой пробы. Для значений C_t и $\Delta\Delta C_t$ определялся коэффициент вариации (coefficient of variation, CV) (Таблица 3).

Таблица 3. CV (coefficient of variation)% значений C_t и $\Delta\Delta C_t$ для цервикальной пробы, положительной по метилированию

	Тип образца	Тип образца (%)	Тип образца (%)
Значение C_t	Внутренний контроль качества пробы (т. е. АСТВ)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
Значение $\Delta\Delta C_t$	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Общий статистический разброс значений C_t для пробы указанной выше концентрации составил 1,32 % для внутреннего контроля качества пробы (АСТВ), 1,52 % — для *FAM19A4* и 1,64 % — для *hsa-mir124-2*. Общий статистический разброс значений $\Delta\Delta C_t$ для пробы указанной выше концентрации составил 5,97% для *FAM19A4* и 5,75% — для *hsa-mir124-2*.

Интерферирующие вещества

В качестве ингибиторов, способных оказывать действие на ход ПЦР, были выбраны десульфонирующий и промывочный буферы из набора для бисульфитного конвертирования. Вещества, потенциально присутствующие в исходной пробе, не исследовались исходя из того факта, что ДНК пробы дважды очищается кремниевыми гранулами, т. е. выполняются выделение ДНК из исходной пробы и очистка ДНК после бисульфитного конвертирования. Было зафиксировано интерферирующее влияние десульфонирующего и промывочного буферов в следовых количествах на ход ПЦР. Оно было выявлено по недействительному результату анализа для внутреннего контроля качества пробы.

Клиническая эффективность

Цервикальные образцы, положительные по ВПЧ*

Клиническая эффективность QIASure Methylation Test в отношении цервикальной интраэпителиальной неоплазии 3-й степени (ЦИН 3) и рака шейки матки (т. е. ЦИН 3+) оценивалась в многоцентровом ретроспективном исследовании на территории ЕС (13). QIASure Methylation Test оценивали по 2384 скрининговым образцам пациенток (возраст 29–76 лет), положительным по ВПЧ, из четырех стран ЕС (Шотландия, Словения, Дания, Нидерланды)(13). Образцы собирали в среду PreservCyt или SurePath. В исследование были включены 2012 пациенток без признаков заболевания в течение двухлетнего наблюдения (сокращено $\leq$ ЦИН 1), 124 — с ЦИН 2, 228 — с ЦИН 3 и 20 — с развившимся онкологическим заболеванием. Из цервикальных проб выделялась ДНК, и 250 нг ДНК использовалось в качестве исходного материала для реакции бисульфитного конвертирования (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Из 250 нг модифицированной ДНК 20 % использовалось для ПЦР (это соответствовало 50 нг исходной целевой ДНК/одну ПЦР). Далее представлены общие процентные показатели полученных при использовании QIASure Methylation Test положительных результатов, стратифицированные по клиническим конечным точкам (Таблица 4).

* Цервикальные образцы, собранные врачом.

Таблица 4. Процентные показатели положительных результатов, полученных при использовании QIASure Methylation Test

Клиническая конечная точка	Соотношение	Процентный показатель положительных результатов (95 % ДИ)
≤ЦИН 1	437/2012	21,7 % (20–23,6)
ЦИН 2	58/124	46,8 % (38,1–56,6)
ЦИН 3	176/228	77,2 % (71,3–82,2)
Рак шейки матки	19/20	95,0 % (70,7–99,3)

Для цервикальных проб, положительных по ВПЧ высокого риска, чувствительность применительно к ЦИН 3+ составила 78,6% (195/248; 95 % ДИ: 73,1–88,3) при общей специфичности QIASure Methylation Test 78,3% (n = 2013; 95 % ДИ: 76–80). Отрицательное прогностическое значение для исходов, положительных по ВПЧ высокого риска (hrHPV) и отрицательных по метилированию, составило 99,9 % для рака шейки матки (N = 1694, 95 % ДИ: 99,6–99,99), 96,9 % для ЦИН 3+ (95 % ДИ: 96–98) и 93,0 % для ЦИН 2+ (95 % ДИ: 92–94).

Кроме того, чувствительность метода для рака шейки матки оценивали в многоцентровом международном ретроспективном исследовании 519 случаев инвазивного рака разных гистотипов из 25 стран (11). Из цервикальных проб выделялась ДНК, и 250 нг ДНК использовалось в качестве исходного материала для реакции бисульфитного конвертирования (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Из 250 нг модифицированной ДНК 20 % использовалось для ПЦР (это соответствовало 50 нг исходной целевой ДНК/одну ПЦР). В 510 из 519 случаев был получен положительный результат QIASure Methylation test, с коэффициентом положительности 98,3 % (95 % ДИ: 96,7–99,2). Коэффициенты положительности со стратификацией по гистотипу представлены в Таблица 5. Коэффициент положительности QIASure Methylation Test с образцами рака шейки матки.

Таблица 5. Коэффициент положительности QIASure Methylation Test с образцами рака шейки матки

Клиническая конечная точка	Соотношение	Процентный показатель положительных результатов (95 % ДИ)
Плоскоклеточная карцинома	313/318	98,4 % (96,4–99,5)
Аденокарцинома	121/123	98,4 % (94,2–99,8)
Аденосквамозная карцинома	42/42	100,0 % (91,6–100)
Редкие гистотипы рака	30/32	93,8 % (79,2–99,2)
Гистотип рака не указан	4/4	100 % (39,8–100,0)

Самостоятельно собранные вагинальные соскобы, положительные по ВПЧ

Клиническая эффективность QIASure Methylation Test применительно к самостоятельно собранным вагинальным соскобам в отношении распознавания цервикальной интраэпителиальной неоплазии 3-й степени и рака шейки матки (т. е. ЦИН 3+) оценивалась путем анализа 247 вагинальных образцов, положительных по ВПЧ высокого риска. Для 14 проб (5,7 %) значения Ст для АСТВ были >26,4 и результаты анализа были признаны недействительными. Из проб с действительными результатами анализа 148 самостоятельно собранных соскобов были получены у женщин с ≤ЦИН 1 после 18 месяцев последующего наблюдения, 24 — у пациенток с ЦИН 2, 50 — у пациенток с ЦИН 3, 8 — у больных с плоскоклеточной карциномой и 3 — у больных с аденокарциномой. Из вагинальных образцов выделялась ДНК, и 250 нг ДНК использовалось в качестве исходного материала для реакции бисульфитного конвертирования (EZ DNA methylation kit, ZYMO Research). Из 250 нг бисульфит-конвертированной ДНК 20 % использовалось для ПЦР (это соответствовало 50 нг исходной целевой ДНК/одну ПЦР). Далее представлены процентные показатели полученных при использовании QIASure Methylation Test положительных результатов, стратифицированные по клиническим конечным точкам (Таблица 6).

Таблица 6. Коэффициент положительности QIASure Methylation Test с самостоятельно собранными вагинальными соскобами

Клиническая конечная точка	Соотношение	Процентный показатель положительных результатов (95 % ДИ)
≤ЦИН 1	34/148	23,0 % (16,9-30,4)
ЦИН 2	7/24	29,2 % (14,6-49,8)
ЦИН 3	33/50	66,0 % (52,0–77,7)
Плоскоклеточная карцинома	8/8	100,0 % (63,1-100,0)
Аденокарцинома	3/3	100,0 % (29,2-100,0)

Для вагинальных соскобов, положительных по ВПЧ высокого риска, чувствительность применительно к ЦИН 3+ составила 72,1% (44/61; 95 % ДИ: 59,7–81,9), а применительно к карциноме чувствительность равнялась 100 % (11/11, 95 % ДИ: 72–100).*

Эффективность исследования *FAM19A4* и *hsa-mir124-2* как способа выявления поздно трансформирующихся очагов ЦИН.

Анализ метилирования промоторов в клетках-хозяевах позволяет прицельно выявлять очаги ЦИН на так называемых поздних стадиях, которые характеризуются ракоподобным профилем метилирования и высоким краткосрочным риском перехода в рак (7, 8). Эффективность анализа на гиперметилирование промоторов *FAM19A4* и *hsa-mir124-2* оценивалась путем анализа 29 положительных по ВПЧ высокого риска образцов, полученных у женщин с поздно трансформирующейся ЦИН 2/3 и 19 положительных по ВПЧ высокого риска образцов, полученных у женщин с рано трансформирующейся ЦИН 2/3. Метилирование соотносилось в особенности с поздними стадиями заболевания, причем положительный по гиперметилированию результат был получен для всех очагов поздно трансформирующейся ЦИН 2/3 (100 %; 29/29; 95 % ДИ: 88–100), тогда как для рано трансформирующейся ЦИН 2/3 положительный результат был получен в 47 % случаев (9/19; 95 % ДИ: 27–69).

* Замечание. Гиперметилирование объектов анализа в пробах, полученных у женщин с ЦИН поздних стадий и/или раком шейки матки, может не выявляться из-за вариабельности способов забора проб, например при неправильном заборе пробы.

Надежность

Надежность QIASure Methylation Test определялась как степень совпадения результатов, полученных с помощью QIASure Methylation Test, и результатов, полученных с использованием версии тест-системы, предназначенной только для исследовательских целей (Research Use Only, RUO). Анализ выполнялся на бисульфит-конвертированной геномной ДНК, полученной из 10 цервикальных проб, положительных по ВПЧ высокого риска, 5 из которых были ранее признаны отрицательными по гиперметилированию применительно к обоим маркерам, а другие 5 — положительными по метилированию (напр., минимум по одному из 2 маркеров). Анализ проводился в двух повторностях и 8 циклах четырьмя операторами (один цикл на оператора в день) с использованием двух разных партий продукта и трех разных приборов Rotor-Gene Q MDx, в двух лабораториях. Всего для каждой пробы было получено 16 результатов (Таблица 7).

Таблица 7. Совпадение результатов, полученных с помощью QIASure Methylation Test и версией тест-системы, предназначенной только для исследовательских целей (Research Use Only, RUO)

Номер пробы	Результат, полученный на тест-системе RUO (Research Use Only)	Совпадения с RUO (Research Use Only) в лаб. 1	Совпадения с RUO (Research Use Only) в лаб. 2
1	Отр.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
2	Отр.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
3	Отр.	62,5 % (5/8)	62,5 % (5/8)
4	Отр.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
5	Отр.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Подытог		92,5 % (37/40)	92,5 % (37/40)
6	Пол.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
7	Пол.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
8	Пол.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
9	Пол.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
10	Пол.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Подытог		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Для четырех из пяти проб, ранее признанных отрицательными по метилированию, было продемонстрировано 100 % совпадение при использовании QIASure Methylation Test в обеих лабораториях. Для пробы 3 процент совпадения составил 62,5 % (5/8) для обеих лабораторий. Наблюдаемые отклонения относились к *FAM19A4* и фиксировались в случаях, когда его концентрация приблизительно равнялась порогу обнаружения для тест-системы. Общий показатель совпадения для отрицательных по метилированию проб составил 92,5 % (37/40).

Для всех 5 проб, ранее признанных положительными по метилированию, было продемонстрировано 100 % совпадение с референсной тест-системой — таким образом, общий процент совпадения составил 100 % (40/40).

Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальных образцах

Протокол «Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit» (Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальных образцах с использованием EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit) проверялся путем сопоставления с референсным протоколом (т. е. протоколом бисульфитного конвертирования с предшествующим контролем количества ДНК в пробе) на материале 119 цервикальных соскобов. После контрольного анализа проводился анализ с использованием QIASure Methylation Test. Показатель успеха при бисульфитном конвертировании непосредственно на цервикальных пробах с использованием в качестве исходного материала 2,5 % цервикального образца составил 95,8 % (114/119) и возрос до 100 % после повторного анализа образцов с недействительным результатом с использованием в качестве исходного материала 10 % образца. Процент совпадения результатов анализа с применением QIASure Methylation Test при сравнении протоколов бисульфитного конвертирования составил 90,8 % (108/119; при значении каппа 0,75).

Протокол «Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the QIAasymphony Bisulfite Kit» (Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальных образцах с использованием QIAasymphony Bisulfite Kit) проверялся путем сопоставления с референсным протоколом (т. е. протоколом бисульфитного конвертирования с предшествующим контролем количества ДНК в пробе) на материале 120 цервикальных соскобов. После контрольного анализа проводился анализ с использованием QIASure Methylation Test. Показатель успеха при бисульфитном конвертировании непосредственно на цервикальных пробах с использованием в качестве исходного материала 2,5 % цервикального образца составил 94,2 % (113/120) и возрос до 97,5 % (117/120) при использовании референсного протокола. Процент совпадения результатов анализа с применением QIASure Methylation Test при сравнении протоколов бисульфитного конвертирования составил 94,7 % (107/113; при значении каппа 0,88).

Литература

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

Символы

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие символы.

Символ	Значение символа
	Срок годности
	Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro
	Символ маркировки CE
	Содержит реактивы для <N> реакций
	Номер по каталогу
	Номер партии
	Номер материала
	Компоненты
	Содержит
	Номер
	«R» — редакция инструкции по применению (руководства), «n» — номер редакции
	Глобальный торговый номер единицы
	Ограничение по температуре
	Изготовитель
	Подлежит защите от воздействия света



Обратитесь к инструкции по применению



Внимание!

Контактная информация

По вопросам технической поддержки и для получения дополнительной информации обращайтесь в Центр технической поддержки по адресу www.qiagen.com/Support, по тел. 00800- 22- 44- 6000 или через отделы технической поддержки QIAGEN либо ваших региональных дистрибьюторов (см. последнюю страницу обложки или веб-сайт www.qiagen.com).

Информация для заказа

Продукт	Содержание	№ по каталогу
QIAzure Methylation Test Kit	Для 72 реакций: 2 мастер-микса, 2 калибратора.	616014
QIASymphony SP	Модуль подготовки образцов QIASymphony включает 1 год гарантии на детали и изготовление (дополнительно для автоматического выделения).	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Циклер для real-time PCR и аппарат для плавления с высоким разрешением с 5 каналами (зеленый, желтый, оранжевый, красный, алый) плюс канал HRM, ноутбук, программное обеспечение, дополнительные принадлежности; предусмотрена гарантия 1 год на детали и изготовление, а также услуги по установке и обучению	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Циклер для real-time PCR и аппарат для плавления с высоким разрешением с 5 каналами (зеленый, желтый, оранжевый, красный, алый) плюс канал HRM, ноутбук, программное обеспечение, дополнительные принадлежности; предусмотрена гарантия 1 год на детали и изготовление (услуги по установке и обучению не включены)	9002032

Продукт	Содержание	№ по каталогу
Дополнительные принадлежности к прибору Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Алюминиевый блок для ручного раскапывания реакции в 72 пробирки объемом 0,1 мл с использованием одноканальной пипетки	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 стрипов из 4 пробирок с колпачками для 1000 реакций	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 стрипов из 4 пробирок с колпачками для 10 000 реакций	981106
Rotor-Gene AssayManager — для стандартных процедур анализа с использованием приборов Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene AssayManager	Программа для выполнения стандартных процедур анализа с использованием приборов Rotor-Gene Q и QIAAsymphony RGQ; программа с одиночной лицензией для установки на один компьютер	9022739

Актуальную информацию о лицензиях, а также заявления об отказе от ответственности применительно к конкретным продуктам см. в соответствующем руководстве к набору QIAGEN или руководстве пользователя. С руководствами к наборам QIAGEN и руководствами пользователя можно ознакомиться на веб-сайте по адресу www.qiagen.com. Их также можно заказать через техническую службу QIAGEN или регионального дистрибьютора.

Эта страница оставлена пустой намеренно.

История изменения документа

Дата	Изменения
R4, июнь 2019 г.	Внесены изменения в графическую схему рабочего процесса в разделе «Принцип действия и порядок работы»; добавлен набор EpiTest Fast 96 Bisulfite Kit в раздел «Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки»; изменено содержание раздела «Информация по технике безопасности»; добавлена информация о цикле разогрева для RGQ MDx 5-plex HRM; изменен раздел «Подготовка проб»; добавлен новый пункт в раздел «Поиск и устранение неисправностей»; добавлена тема «Бисульфитное конвертирование непосредственно на цервикальных образцах» в раздел «Рабочие характеристики»; обновлен раздел «Литература»; внесены изменения в схему расположения пробирок
R5, июль 2023 г.	Добавлены приборы QIASymphony для дополнительной автоматизации выделения и QIASymphony Bisulfite kit в список необходимых материалов, не входящих в комплект поставки; изменен раздел о подготовке образцов; добавлены сведения об использовании среды для сбора образцов SurePath; изменен раздел о клинической эффективности. Добавлены заголовки Таблицы 5 и Таблицы 6.

Ограниченное лицензионное соглашение для QIASure Methylation Test

Использование настоящего продукта означает согласие покупателя или пользователя продукта со следующими условиями:

- Изделие можно использовать исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к изделию, и настоящим руководством, причем только с компонентами, которые входят в состав набора. Компания QIAGEN не предоставляет лицензии в рамках своей интеллектуальной собственности на использование или объединение прилагаемых компонентов настоящего набора с любыми компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, прилагаемых к изделию, данному руководстве и дополнительных протоколах, доступных по адресу www.qiagen.com. Некоторые из таких дополнительных протоколов предоставлены пользователями продукции компании QIAGEN для пользователей продукции компании QIAGEN. Такие протоколы не были всесторонне проверены или оптимизированы компанией QIAGEN. Компания QIAGEN не гарантирует их правильности, а также не гарантирует того, что они не нарушают прав третьих лиц.
- Кроме официально заявленных лицензий, компания QIAGEN не предоставляет никаких гарантий того, что данный набор и (или) его использование не нарушают прав третьих лиц.
- Данный набор и его компоненты лицензированы для одnorазового использования и не подлежат повторному использованию, перепродаже или перепродаже.
- Компания QIAGEN прямо отказывается от всех прочих лицензий, заявленных или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено официально.
- Покупатель и пользователь данного набора соглашаются не совершать и не допускать совершения другими лицами каких-либо действий, которые могут привести к любым действиям, запрещенным выше, или способствовать им. Компания QIAGEN может требовать исполнения запретов, предусмотренных настоящим соглашением об ограниченной лицензии, в судебном порядке в любом суде и получать возмещение всех понесенных ею следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, по любому иску, направленному на исполнение настоящего соглашения об ограниченной лицензии или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с набором и/или его компонентами.

Актуальные условия лицензии см. на веб-сайте по адресу www.qiagen.com

Официальным производителем QIASure Methylation Test является компания Self-screen B.V.

Тест-система QIASure Methylation Test производится Self-screen B.V., а ее продажа в Европе осуществляется компанией QIAGEN.

Товарные знаки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *digene*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (рынка QIAGEN); BD®, SurePath® (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyt® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.).
зарегистрированные наименования, товарные знаки и т. п., используемые в данном документе, даже не отмеченные как таковые, не должны рассматриваться как не защищенные законодательством.

07-2023 HB-2304-005 1132288RU © QIAGEN, 2023 г. Все права защищены.

Для заказа: www.qiagen.com/shop | Техническая поддержка: support.qiagen.com |
Веб-сайт: www.qiagen.com