

červenec 2023

QIASure™ Methylation Test

Návod k použití (příručka)



Verze 1

K použití s přístrojem Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM



616014

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

1132288CS

Obsah

Účel použití	4
Shrnutí a vysvětlení	5
Princip postupu	5
Dodávané materiály	7
Obsah sady	7
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky	7
Varování a bezpečnostní opatření	10
Informace o bezpečnosti	10
Všeobecná bezpečnostní opatření	10
Bezpečnostní opatření profilu AssayManager	12
Skladování činidel a manipulace s nimi	13
Manipulace se vzorky a jejich uložení	14
Příprava alikvotu – alikvoty skladované v odběrovém médiu PreservCyt	16
Příprava alikvotu – alikvoty skladované v odběrovém médiu SurePath™	19
Obecná doporučení pro konverzi hydrogensířičitanem	20
Protokol: PCR s testem QIASure Methylation Test v přístroji Rotor-Gene Q MDx	
5plex HRM	21
Interpretace výsledků	34
Návod na řešení potíží	38
Omezení	40
Charakteristika funkčních vlastností	42
Limit detekce (Limit of Detection, LOD)	42

Linearita	42
Přesnost.....	42
Interferující látky	43
Klinická účinnost.....	44
Robustnost.....	47
Literatura	50
Symboly.....	52
Kontaktní údaje	53
Informace pro objednání.....	54
Historie revizí dokumentu	57

Účel použití

Test QIAure Methylation Test (kat. č. 616014) představuje multiplexní metylační analýzu PCR v reálném čase pro účely detekce hypermetylace promotoru genů *FAM19A4* a *hsa-mir124-2*. Alikvoty, které mohou být testovány pomocí testu QIAure Methylation Test, obsahují DNA konvertovanou hydrogensířičitanem, izolovanou ze vzorků odebraných následujícími způsoby:

- vzorky děložního čípku odebrané pomocí odběrového zařízení *digene*® HC2 DNA Collection Device (odběr lékařem)
- cervikální vzorky odebrané pomocí kartáčkového typu odběrového zařízení a umístěné do roztoku PreservCyt® Solution nebo SurePath™ Solution (odběr lékařem)
- vaginální vzorky odebrané kartáčkovým zařízením (samoodběr)

Indikace k použití:

1. Jako kontrolní test u žen s pozitivním výsledkem testu na lidský papillomavirus (HPV) pro účely rozhodnutí o nutnosti doporučit pacientku ke kolposkopii nebo na jiné kontrolní výkony.
2. Jako kontrolní test pro ženy s výsledky Pap testu s atypickými dlaždicovými buňkami neurčeného významu (ASC-US) pro účely stanovení potřeby doporučit pacientku ke kolposkopii nebo na jiné kontrolní výkony.

Tento produkt je určen k použití profesionálními uživateli, jako jsou technici a laboranti, kteří jsou vyškoleni v diagnostických postupech *in vitro*, technikách molekulární biologie a systému Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

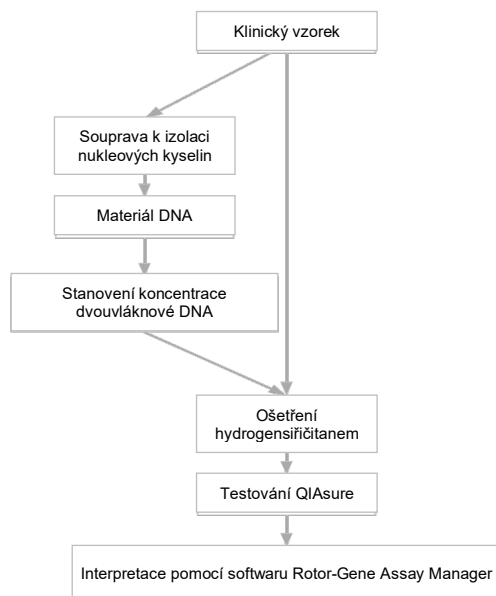
Shrnutí a vysvětlení

Metylace DNA je biochemický proces, který je důležitý pro normální vývoj vyšších organismů (1). Zahrnuje přidání metylové skupiny do 5. pozice pyrimidinového kruhu cytosinového nukleotidu. Abnormální vzorce metylace DNA také hrají důležitou roli v karcinogenezi. U několika typů lidské rakoviny a rakovinných buněčných linií, včetně rakoviny děložního čípku a karcinomu endometria, byla detekována hypermethylace promotoru genů *FAM19A4* (skupina s podobností sekvencí 19 (chemokinový (C-C motiv)-like) člen A4) a/nebo *hsa-mir124-2* (*homo sapiens micro RNA 124-2*) (2–6). Analýza metylace promotoru hostitelských buněk specificky detekuje rakovinu a takzvané „pokročilé“ léze cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN), které nesou metylační profil podobný rakovině a mají vysoké krátkodobé riziko progresu a vzniku rakoviny (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). Analýza QIASure umožňuje detekci hypermethylace promotoru genů *FAM19A4* a *hsa-mir124-2* u DNA konvertované hydrogensířičitanem izolované z cervikálních nebo vaginálních vzorků pomocí ACTB (lidský gen β -aktinu) jako interní kontroly kvality alikvotu.

Princip postupu

Test QIASure Methylation Test představuje multiplexní test real-time PCR, který amplifikuje metylované oblasti promotoru genů potlačujících nádory *FAM19A4* a *hsa-mir124-2*, stejně jako fragment referenčního genu při nespecifické metylaci. Souprava obsahuje 2 zkumavky směsi QIASure Master Mix a 2 zkumavky kalibrátoru QIASure Calibrator. Směs Master Mix je určena pro amplifikaci DNA konvertované hydrogensířičitanem připravené z klinických vzorků. Směs Master Mix obsahuje primery a sondy pro cílové geny a referenční gen, sloužící jako interní kontrola kvality alikvotu. Kalibrátor je linearizovaný plazmid obsahující sekvence *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* a ACTB amplikony.

Pracovní postup



Analýza QIAsure probíhá na přístroji Rotor-Gene Q MDx a software Rotor-Gene AssayManager® automaticky provádí analýzu a interpretaci dat. Hodnota C_T (práh cyklu) představuje počet cyklů PCR nezbytných pro detekci fluorescenčního signálu nad signálem v pozadí, který koreluje s počtem cílových molekul přítomných v alikvotu. Analýza QIAsure vypočítá hodnotu ΔC_T jako rozdíl mezi cílovými hodnotami C_T *FAM19A4* nebo *hsa-mir124-2* a referenční hodnotou C_T (ACTB). Tato hodnota ΔC_T představuje relativní kvantitativní hodnotu pro úroveň metylace promotoru genu *FAM19A4* nebo *hsa-mir124-2*. Pro normalizaci se hodnota ΔC_T alikvotu kalibrátoru odečte od ΔC_T cílů *FAM19A4* nebo *hsa-mir124-2*, což se ve výsledku rovná hodnotě $\Delta\Delta C_T$ (9). Kalibrátor je standardizovaný alikvot plazmidové DNA se známým počtem kopií ze tří cílů (tj. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* a ACTB).

Dodávané materiály

Obsah sady

QIASure Methylation Test		72
Katalogové č.		616014
Počet reakcí		72
QIASure Master Mix (2 zkumavky)	Hnědá zkumavka	630 µl
QIASure Calibrator (2 zkumavky)	Transparentní zkumavka	25 µl
Návod k použití testu QIASure Methylation Test (příručka)		1

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Spotřební materiál a činidla pro přípravu alikvotů pro odebrané alikvoty

- Roztok Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Činidla pro přípravu alikvotů uložených v odběrovém médiu SurePath.

- Pufr Buffer AL (katalogové číslo QIAGEN: 19075)

Spotřební materiál a činidla pro konverzi hydrogensířičitanem

Verifikovaná souprava ke konverzi hydrogensířičitanem obsahuje:

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

Spotřební materiál pro přístroj Rotor-Gene Q MDx

- Strip tubes and Caps, 0,1 ml (kat. č. 981103)
- Purifikovaná voda (např. čistoty pro molekulární biologii, destilovaná nebo deionizovaná)

Vybavení

- Nastavitelné pipety* určené výhradně pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl)
- Jednorázové rukavice
- Stolní odstředivka* s rychlostí > 10 000 ot./min.
- Vířivý mixér*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, kat. č. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, kat. č. ND-3300) nebo ekvivalentní
- Systém QIASymphony SP (kat. č. 9001297) pro volitelnou automatickou extrakci a/nebo konverzi hydrogensířičitanem

* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

Vybavení pro real-time PCR

- Systém Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat. č. 9002033) nebo přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat. č. 9002032)*
- Aplikace Rotor-Gene AssayManager Core Application softwarové verze 1.0.x (kde x je větší nebo rovno 4)
- Nainstalovaný modul Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in, verze 1.0.x (kde x je větší nebo rovno 1)
- Profil analýzy QIASure Assay Profile (ze souboru AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (kde Y se rovná nebo je větší než 1) pro aplikaci pro DNA konvertovanou hydrogensířičitanem, získanou z cervikálních vzorků odebraných lékařem
- Profil analýzy vlastního vzorku z kartáčku QIASure (ze souboru AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (kde Y se rovná nebo větší než 0) pro aplikaci pro DNA konvertovanou hydrogensířičitanem, získanou z vlastních vzorků z vaginálního kartáčku

* Přístroj Rotor-Gene Q 5plex HRM s datem výroby v lednu 2010 nebo později. Datum výroby lze zjistit ze sériového čísla uvedeného na zadní straně přístroje. Sériové číslo je ve formátu „mmrrnnn“, kde „mm“ čísla označuje měsíc výroby v číslicích, „rr“ označuje poslední dvě číslice roku výroby a „nnn“ označuje jedinečný identifikátor přístroje.

Varování a bezpečnostní opatření

Pouze pro diagnostiku in vitro.

Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici on-line v praktickém a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou soupravu QIAGEN® a pro každou komponentu těchto souprav.

QIASURE MASTER MIX



Obsahuje: 1,2,4-triazol: Nebezpečí! Podezření na možnost poškození plodnosti nebo nenarozeného dítěte. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

Všeobecná bezpečnostní opatření

Použití testů PCR vyžaduje správnou laboratorní praxi, včetně údržby vybavení, které je určeno pro molekulární biologii a splňuje příslušné předpisy a normy.

Vždy věnujte pozornost následujícím okolnostem:

- Při manipulaci se vzorky vždy používejte jednorázové rukavice bez pudru, laboratorní plášť a ochranné brýle.
- Zamezte mikrobiální a nukleázové (DNázové) kontaminaci vzorku a soupravy. DNáza může způsobit poškození templátu DNA.
- Zamezte přenosové kontaminaci produktu DNA nebo PCR, která může mít za následek falešně pozitivní signál.
- Vždy používejte jednorázové pipetové špičky bez DNázy s aerosolovými bariérami.
- Činidla analýzy QIASure jsou optimálně naředěny. Činidla dále neřeďte. Může to mít za následek zhoršení kvality provedení analýzy.
- Všechna činidla dodávaná v soupravě QIASure jsou určena k použití výhradně s ostatními činidly dodanými ve stejné soupravě. Žádné činidlo z jedné soupravy nenahrazujte stejným činidlem z jiné soupravy QIASure, ani ze stejné šarže. Může to mít vliv na funkční vlastnosti.
- Viz uživatelská příručka přístroje Rotor-Gene Q MDx, kde naleznete další varování, bezpečnostní opatření a postupy.
- Před prvním cyklem dne přístroje Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM proveďte zahřívací cyklus při teplotě 95 °C po dobu 10 minut.
- Změna inkubačních dob a teplot může mít za následek chybné nebo nesouhlasné údaje.
- Nepoužívejte součásti soupravy, které expirovaly nebo byly nesprávně skladovány.
- Minimalizujte vystavení součástí světlu: reakční směsi se mohou vlivem světla měnit.
- Dbejte maximální opatrnosti, aby se zabránilo kontaminaci směsí syntetickými materiály, které jsou obsaženy v činidlech PCR.
- Alikvoty a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Bezpečnostní opatření profilu AssayManager

Pro různé typy alikvotů jsou vyžadovány různé profily systému AssayManager. Zajistěte, aby se pro každý profil použil správný typ alikvotu, jak je uvedeno níže:

- K testování DNA konvertované hydrogensířičitanem, získané z cervikálních vzorků odebraných lékařem, musí být použit profil analýzy „QIASure cervical scrapes Assay Profile“ (Profil analýzy cervikální stěrů QIASure; ze souboru AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)
- K testování DNA konvertované hydrogensířičitanem, získané ze vzorků ze samoodběru vaginálním kartáčkem, musí být použit profil analýzy „QIASure self-collected brush specimens Assay Profile“ (Profil analýzy vzorků ze samoodběru vaginálním kartáčkem QIASure; ze souboru AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)

Skladování činidel a manipulace s nimi

Podmínky pro přepravu

Test QIAure Methylation Test je dodáván na suchém ledu. Pokud není jakákoliv součást testu QIAure Methylation Test při dodání zmrzlá, během přepravy došlo k otevření vnějšího obalu nebo zásilka neobsahuje balicí list, příručky nebo činidla, obraťte se na oddělení technických služeb společnosti QIAGEN nebo na místní prodejce (viz zadní obálka nebo navštivte stránky www.qiagen.com).

Podmínky skladování

Test QIAure Methylation Test uložte po dodání bez prodlení do mrazničky a skladujte v temnu při konstantní teplotě -30 až -15 °C.

Stabilita

Při skladování dle stanovených podmínek je test QIAure Methylation Test stabilní do data expirace uvedeného na štítku krabičky.

Po otevření lze činidla skladovat v původních obalech při teplotě -30 až -15 °C. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení. Nepřekračujte maximální počet 3 cyklů zmrazení/rozmrazení.

- Všechny zkumavky před otevřením jemně promíchejte tím, že je 10krát otočíte dnem vzhůru, a všechny je odstředíte.
- Datum expirace pro každé činidlo je uvedeno na jednotlivém štítku dané součásti. Při použití stejných šarží součástí si za správných podmínek skladování výrobek zachová své vlastnosti po dobu stability.

Manipulace se vzorky a jejich uložení

UPOZORNĚNÍ 	Se všemi vzorky se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.
--	---

Vzorky z děložního čípku

Souprava QIASure je určena pro alikvoty genomové DNA konvertované hydrogensířičitanem, získané ze vzorků děložního čípku. Validovaná odběrová média pro cervikální vzorky (stěry) jsou odběrové médium PreservCyt®, odběrové médium SurePath™ a přepravní médium *Digene* Specimen Transport Medium (STM). Optimální teplota skladování klinických alikvotů při doručení do laboratoře je 2–8 °C. Za těchto podmínek skladování jsou alikvoty v odběrovém médiu PreservCyt nebo SurePath™ stabilní po dobu 3 měsíců před extrakcí DNA.

Poznámka: Alikvoty z děložního čípku v médiu STM lze přepravovat při teplotě 2–30 °C jako dodávku přes noc do zkušební laboratoře a po převzetí opakovaně rozmrazit při teplotě –20 °C.

Vlastní vzorky z vaginálního kartáčku (samoodběr)

Test QIASure Methylation Test je určen pro použití s alikvoty genomové DNA konvertované hydrogensířičitanem, extrahovanými z vlastních vzorků z vaginálního kartáčku. Vzorky získané samoodběrem vaginálním kartáčkem mohou být odebrány a odeslány v suchém stavu a po příchodu do laboratoře jsou uloženy v odběrovém médiu PreservCyt s doporučeným objemem pro skladování 2–3 ml. Alikvoty v odběrovém médiu PreservCyt mohou být skladovány při teplotě 2–8 °C nebo pokojové teplotě po dobu nejvýše 3 měsíců.

Alikvoty genomové DNA

Jakmile je genomová DNA extrahována, mohou být alikvoty DNA uskladněny a přepravovány při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu až 12 měsíců.

Příprava alikvotu – alikvoty skladované v odběrovém médiu PreservCyt

Test QIASure Methylation Test byl validován pro použití s genomovou DNA konvertovanou hydrogensířičitanem, získanou z cervikálních vzorků. Konverze genomové DNA hydrogensířičitanem může být provedena:

- i) před extrakcí DNA v alikvotu a kontrolou kvality DNA nebo
- ii) přímo na cervikálním vzorku pomocí soupravy EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat. č. 59720) nebo
- iii) přímo na cervikálním vzorku pomocí soupravy QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN kat. č. 931106).

Naše doporučení jsou uvedena níže.

- i) Konverze hydrogensířičitanem s předchozí extrakcí DNA a kontrolou kvality DNA
Tento protokol vyžaduje extrakci DNA, měření koncentrace DNA, následovanou alikvotováním optimálního objemu eluátu před zahájením protokolu konverze hydrogensířičitanem. Protokol byl ověřen pro soupravu EZ DNA Methylation™ Kit (kat. č. D5001) a soupravu EZ DNA Methylation-Lightning Kit (kat. č. D5030) od společnosti ZYMO Research. Doporučujeme následující metody:

- Extrakce DNA

S tímto testem QIASure Methylation Test jsou kompatibilní standardní soupravy na extrakci DNA (např. soupravy kolonkové nebo na bázi magnetických kuliček).

- Měření koncentrace DNA

Před konverzí DNA hydrogensířičitanem proveďte měření koncentrace DNA.

Vhodné systémy pro měření koncentrací DNA jsou Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba od společnosti Thermo Fisher Scientific) nebo ekvivalentní.

- Alikvotování eluátu DNA

Optimální vstup DNA pro konverzi hydrogensířičitanem se pohybuje v rozmezí od 100 ng do 2 µg, pro konverzi hydrogensířičitanem se doporučuje 200 ng. Pokud je koncentrace DNA pro konverzi hydrogensířičitanem příliš nízká, opakujte extrakci DNA s vyšším vstupním objemem klinického alikvotu nebo eluujte DNA v menším elučním objemu.

- Konverze hydrogensířičitanem pomocí souprav EZ DNA Methylation Kit a EZ DNA Methylation-Lightning Kit se provádí podle doporučení výrobce.

Poznámka: Podle soupravy EZ DNA Methylation Kit by maximální množství alikvotu DNA nemělo překročit 2 µg, aby bylo dosaženo dostatečně vysoké účinnosti konverze (> 98 %).

- ii) Konverze hydrogensířičitanem přímo na cervikálním vzorku se soupravou EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit

Konverze hydrogensířičitanem přímo prováděná na cervikálních vzorcích odebraného do roztoku PreservCyt® Solution byla ověřena pro soupravu EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit od společnosti QIAGEN. U alikvotů DNA s vysokou koncentrací (1 ng – 2 µg) odkazujeme na příručku *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion Handbook* podle doporučení výrobce, s výjimkou následujících položek:

- Krok 1 protokolu. Odeberte 2,5 % cervikálního vzorku v odběrovém médiu PreservCyt® (tj. 500 µl z 20 ml) a odstředěním při minimálních otáčkách 3 390 × g po dobu 10 minut vytvořte pelet. Odstraňte supernatant se zanecháním buněčného peletu v maximálním množství 20 µl odběrového média PreservCyt. K reakci konverze hydrogensířičitanem použijte tento alikvot buněčných pelet a pokračujte krokem 2 dle protokolu výrobce.
- Buffer BL: Nepřidávejte nosičovou RNA.
- Eluční objem DNA konvertované hydrogensířičitanem je 50 µl pufru Buffer EB pro každý alikvot.

- *iii) Konverze hydrogensířičitanem přímo na cervikálním vzorku se soupravou QIAasymphony Bisulfite Kit*

Konverze hydrogensířičitanem prováděná přímo na cervikálních vzorcích odebraných do roztoku PreservCyt® Solution byla ověřena pro soupravu QIAasymphony Bisulfite Kit od společnosti QIAGEN. Odkazujeme na příručku soupravy QIAasymphony Bisulfite Kit; testování se provádí podle doporučení výrobce.

- Odeberte 2,5 % cervikálního vzorku v odběrovém médiu PreservCyt® (tj. 500 µl z 20 ml) a odstředěním při minimálních otáčkách 3 390 × g po dobu minut 10 minut vytvořte pelet. Odstraňte supernatant se zanecháním buněčného peletu v maximálním množství 20 µl zbytkového odběrového média PreservCyt.
- Pro reakci konverze hydrogensířičitanem postupujte podle listu protokolu „QIAasymphony SP protocol sheet – Bisulfite 140_HC_V“, a to od kroku 2, místo DNA použijte buněčný pelet.
- Po dokončení reakce konverze hydrogensířičitanem spusťte běh SP na QIAasymphony podle kroků popsaných v protokolu „Bisulfite conversion of unmethylated Cytosines in different sample types“ (Konverze nemetylovaných cytosinů hydrogensířičitanem v různých typech alikvotů) z příručky k soupravě QIAasymphony Bisulfite Kit. Eluce se provádí v objemu 40 µl.

Příprava alikvotu – alikvoty skladované v odběrovém médiu SurePath™

Alikvoty skladované v odběrovém médiu SurePath je třeba před extrakcí DNA předem upravit. Test QIAure Methylation Test byl validován pro použití s genomovou DNA konvertovanou hydrogensířičitanem, získanou z cervikálních vzorků podle níže uvedeného postupu.

- Odeberte 2,5 % cervikálního alikvotu.
- Odstředějte 10 minut při otáčkách 4 000 g, odstraňte supernatant, ale ponechte 100 µl roztoku SurePath™.
- Přidejte 100 µl pufru Buffer AL a resuspendujte pelet.
- Dobře promíchejte a inkubujte 20 minut při teplotě 90 °C.
- Nechte 5 minut chlznout při teplotě místnosti.
- Proveďte extrakci DNA pomocí soupravy QIAamp DNA Mini Kit (nebo ekvivalentní soupravy) podle pokynů výrobce, eluujte DNA v 50 µl.
- Změřte koncentraci DNA, vhodné systémy jsou Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba od společnosti Thermo Fisher Scientific) nebo ekvivalentní.
- Pro konverzi hydrogensířičitanem se doporučuje 200 ng DNA, pokud není 200 ng k dispozici, použijte maximální vstupní objem. Proveďte konverzi pomocí soupravy EZ DNA Methylation Kit nebo EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo) podle pokynů výrobce. Pro test QIAure Methylation Test použijte 2,5 µl eluátu.

Obecná doporučení pro konverzi hydrogensířičitanem

Reakce konverze hydrogensířičitanem by měla být prováděna na určeném místě odděleně od místa, kde je skladována a dávkována směs QIASure Master Mix, aby nedošlo ke kontaminaci činidel.

Vstup do reakce QIASure je 2,5 µl DNA konvertované hydrogensířičitanem.

Pokud je interní kontrola kvality alikvotu negativní (tj. hodnoty ACTB $C_T > 26,4$), výsledný preparát DNA konvertované hydrogensířičitanem vedl ke vzniku materiálu s nedostatečným množstvím a/nebo kvalitou a je hodnocen jako neplatný. Provedte doporučené kroky, abyste dosáhli hodnoty ACTB C_T , která je v platném rozsahu pro následující:

- Konverze hydrogensířičitanem s předchozí extrakcí DNA a kontrolou množství DNA: Opakujte reakci konverze hydrogensířičitanem s vyšší hodnotou vstupního alikvotu DNA a/nebo opakujte izolaci DNA s vyšší hodnotou vstupního vzorku děložního čípku
- Konverze hydrogensířičitanem přímo na vzorku z děložního čípku: Opakujte reakci konverze hydrogensířičitanem s 10 %* cervikálního vzorku v odběrovém médiu PreservCyt (tj. 2 ml z 20 ml).

DNA konvertovaná hydrogensířičitanem může být uložena až 24 hodin při 2–8 °C až 5 dní při –25 až –15 °C a až 3 měsíce při teplotě nižší než –70 °C. Vždy je třeba zamezit opakovanému zmrazování a rozmrazování DNA konvertované hydrogensířičitanem. Počet cyklů zmrazení a rozmrazení by neměl přesáhnout tři, aby byla zachována dostatečná kvalita.

* Objem alikvotu pro přímou konverzi hydrogensířičitanem může být zvýšen, pokud je míra úspěšnosti neuspokojivá kvůli variabilitě odběru vzorků, například v důsledku nedostatečného odběru vzorků.

Protokol: PCR s testem QIASure Methylation Test v přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*

Důležité body před zahájením používání

- Před zahájením protokolu věnujte dostatek času seznámení se s přístrojem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Viz uživatelská příručka přístroje (kat. č. 9002033 nebo 9002032).
- Před prvním cyklem dne přístroje Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM proveďte zahřívací cyklus při teplotě 95 °C po dobu 10 minut.
- Software Rotor-Gene AssayManager v1.0 umožňuje automatickou interpretaci výsledků PCR. Souprava QIASure musí být spuštěna na přístroji Rotor-Gene Q MDx pomocí softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0. Věnujte dostatek času seznámení se se softwarem Rotor-Gene AssayManager v1.0 (kat. č. 9022739) a s plug-inem „Epsilon Plug-in“; v obou případech nahlédněte do uživatelských příruček.
- Pro různé typy alikvotů jsou vyžadovány různé profily analýz v softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0. Zajistěte, aby se pro každý profil použil správný typ alikvoty, jak je uvedeno níže:
 - K testování DNA konvertované hydrogensířičitanem, získané ze vzorků z děložního čípku (cervikálních stěrů) odebraných lékařem, musí být použit profil analýzy „QIASure Assay Profile“ (ze souboru AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)
 - K testování DNA konvertované hydrogensířičitanem, získané z vlastních vzorků z vaginálního kartáčku, musí být použit profil analýzy „QIASure Assay Profile“ (ze souboru AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)

* Přístroj Rotor-Gene Q 5plex HRM s datem výroby v lednu 2010 nebo později. Datum výroby lze zjistit ze sériového čísla uvedeného na zadní straně přístroje. Sériové číslo je ve formátu „mmrrnnn“, kde „mm“ označuje měsíc výroby v číslicích, „rr“ označuje poslední dvě číslice roku výroby a „nnn“ označuje jedinečný identifikátor přístroje.

Poznámka: V rámci jednoho experimentu lze testovat pouze jeden typ alikvotu.

Jednotlivé profily analýz byly optimalizovány pro každý typ alikvotu a je nezbytné, aby si zákazníci vybrali správný profil analýzy pro získání optimálních výsledků pro každý konkrétní typ alikvotu.

Co je třeba udělat, než začnete

- Na počítači připojeném k přístroji Rotor-Gene Q MDx musí být nainstalován software Rotor-Gene AssayManager verze v1.0.x (kde x je větší nebo rovno 4). Podrobnosti o instalaci základního softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application najdete v *uživatelské příručce Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application*.
- Test QIASure Methylation Test vyžaduje specifický plug-in „Epsilon Plug-in“ (verze 1.0.1 nebo vyšší). Tento plug-in lze stáhnout z webové stránky společnosti QIAGEN: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Tento plug-in musí být nainstalován v počítači, který již má nainstalovaný software Rotor-Gene AssayManager verze 1.0.x (kde x je větší než nebo rovno 4).
- Test QIASure Methylation Test vyžaduje spuštění profilu specifického pro analýzu pomocí softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0. Tento profil analýzy obsahuje všechny parametry potřebné pro cyklování a analýzu experimentu. K dispozici jsou 2 profily QIASure Assay Profile:
 - Profil „QIASure Assay Profile“ (ze souboru AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) odpovídá vzorkům děložního čípku odebraným lékařem
 - Profil „QIASure Assay Profile“ (ze souboru AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) odpovídá vlastním vzorkům z vaginální kartáčky. Profily si můžete stáhnout z webové stránky QIASure Methylation Test: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Profil analýzy je nutno importovat do softwaru Rotor-Gene AssayManager.

Poznámka: Soupravu QIASure lze spustit pouze tehdy, pokud jsou naprogramována určitá nastavení konfigurace v softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Kvůli celosystémové bezpečnosti procesu musí být pro uzavřený režim provedena následující konfigurační nastavení:

- „Material number required“ (Je vyžadováno číslo materiálu)
- „Valid expiry date required“ (Je vyžadováno platné datum expirace)
- „Lot number required“ (Je vyžadováno číslo šarže)

Instalace Epsilon Plug-inu a import profilu analýzy

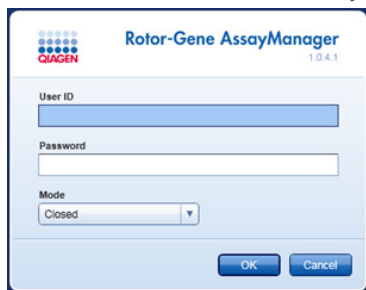
Instalace a import plug-inu Epsilon Plug-in a profilu analýzy jsou podrobně popsány v uživatelských příručkách *Rotor-Gene AssayManager Core Application* a *Epsilon Plug-In*.

- Stáhněte si Epsilon Plug-in a nejnovější verzi profilu analýzy QIASure Assay Profile z webových stránek společnosti QIAGEN.
- Instalaci zahájíte dvojkliknutím na soubor EpsilonPlugin.Installation.msi; postupujte podle pokynů pro instalaci. Podrobný popis tohoto postupu najdete v části „Installing Plug-ins“ (Instalace plug-inů) v uživatelské příručce *AssayManager Core Application*.

Poznámka: Pro bezpečnost celého postupu vyberte v systému kartu Settings (Nastavení) a zaškrtněte políčka Material number required (Požadované číslo materiálu), Valid expiry date required (Platné datum expirace) a Lot number required (Požadované číslo šarže) pro uzavřený režim (část Work list (Pracovní seznam)). Pokud tyto možnosti nejsou povoleny (zaškrtnuty), aktivujte je kliknutím.

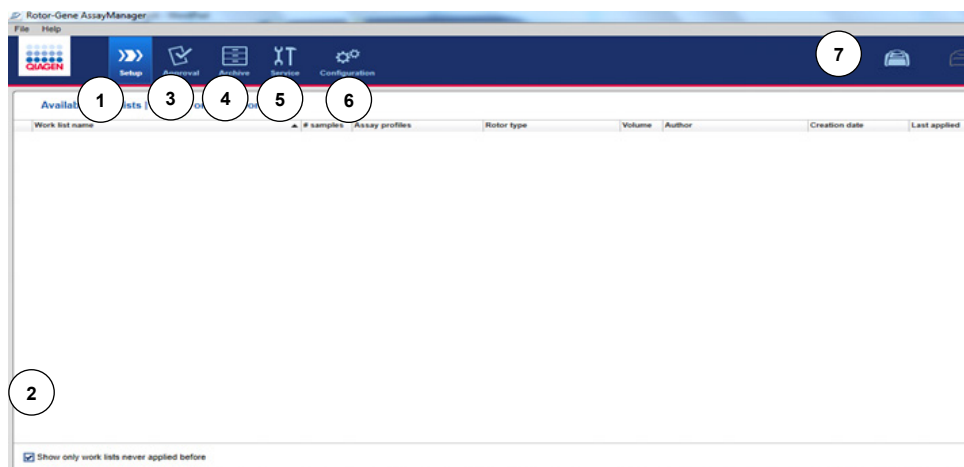
- Po úspěšné instalaci plug-inu bude muset osoba s administrátorskými právy k softwaru Rotor Gene AssayManager importovat profil analýzy AP_QIASure_V1_0_Y.iap následujícím způsobem.

1. Otevřete software Rotor-Gene AssayManager kliknutím na ikonu.  Otevře se okno softwaru Rotor-Gene AssayManager (viz obrázek 1).



Obrázek 1. Přihlašovací obrazovka softwaru Rotor-Gene AssayManager.

2. Přihlaste se k softwaru Rotor-Gene AssayManager pomocí svého ID uživatele a hesla. Neměňte režim „Closed“ (Uzavřený). Klikněte na OK (OK). Otevře se obrazovka softwaru Rotor-Gene Assay Manager (viz níže).



- 1 Záložka Set-up (Nastavení). Tato záložka umožňuje správu nebo použití pracovních seznamů.
- 2 Kontroluje použití pracovních seznamů a zobrazuje pouze nové pracovní seznamy.
- 3 Karta Approval (Schválení). Tato karta umožňuje vyhledat předchozí experimenty (běhy zpracování vzorků).
- 4 Karta Archive (Archiv). Umožňuje vyhledat staré experimenty (běhy zpracování vzorků), které již byly schváleny.

- 5 Záložka Service (Servis). Zobrazí správu auditových stop každého souboru vytvořeného softwarem.
- 6 Záložka Configuration (Konfigurace). Umožňuje provedení konfigurace všech softwarových parametrů
- 7 Ikony Rotor-Gene Q MDx



Nepřipojeno



Připojeno

3. Vyberte prostředí Configuration (Konfigurace).
 4. Vyberte záložku Assay Profiles (Profily analýz).
 5. Klikněte na možnost Import (Importovat).
 6. Zvolte profil analýzy AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap pro cervikální vzorky a/nebo AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap pro import do dialogového okna a klikněte na Open (Otevřít).
 7. Po úspěšném importu profilu analýzy jej lze použít v prostředí „Setup“ (Nastavení).
- Poznámka: Tutéž verzi profilu analýzy nelze importovat dvakrát.

Zpracování alikvotu na přístrojích Rotor-Gene Q MDx s rotorem na 72 zkumavek

Až 70 alikvotů DNA konvertovaných hydrogensířičitanem lze testovat v rámci téhož běhu zpracování (experimentu), kromě kalibrátoru a beztemplátové kontroly. Schéma v tabulce 1 ukazuje příklad plnicího bloku nebo uspořádání rotoru pro cyklus zpracování v rámci testu QIASure Methylation Test. Čísla označují pozice v plnicím bloku a indikují konečnou polohu rotoru.

Tabulka 1. Uspořádání desky a rotoru pro cyklus se soupravou QIASure na přístroji Rotor-Gene Q MDx

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

UPOZORNĚNÍ



Zkumavky musejí být vloženy do rotoru tak, jak je určeno v tabulce 1. Nastavení automatické analýzy v profilu analýzy je založeno na tomto rozvržení. Použití jiného uspořádání povede k získání neplatných výsledků.

Poznámka: Všechny nepoužité pozice vyplňte prázdnými zkumavkami.

PCR na přístrojích Rotor-Gene Q MDx s rotorem na 72 zkumavek

Před prvním cyklem dne přístroje Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM proveďte zahřívací cyklus při teplotě 95 °C po dobu 10 minut.

1. Vytvořte pracovní seznam pro alikvot, který má být zpracován, následujícím způsobem:

- 1a. Zapněte přístroj Rotor-Gene Q MDx.
- 1b. Otevřete software Rotor-Gene AssayManager a přihlaste se jako uživatel v roli obsluhy v uzavřeném režimu.
- 1c. Ve správci pracovních seznamů klikněte na New work list (Nový pracovní seznam) (Prostředí „Setup“ (Nastavení)).
- 1d. Vyberte profil analýzy QIASure Assay Profile ze seznamu dostupných profilů analýz.

Poznámka: Profil analýzy AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap odpovídá vzorkům z děložního čípku; profil analýzy

AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap odpovídá vlastním alikvotům z vaginálního kartáčku.

Poznámka: V rámci jednoho experimentu lze testovat pouze jeden typ alikvotu.

- 1e. Kliknutím na Move (Přenést) přeneste vybraný profil analýzy do seznamu Selected assay profiles (Vybrané profily analýz). Profil analýzy by nyní měl být zobrazen na seznamu „Selected assay profiles“ (Vybrané profily analýz).
- 1f. Do odpovídajícího pole zadejte počet alikvotů.
- 1g. Zadejte následující informace o soupravě QIASure, které jsou vytištěny na víčku krabičky.
 - Číslo materiálu: 1102417
 - Platné datum expirace ve formátu RRRR-MM-DD
 - Číslo šarže
- 1h. Vyberte krok Samples (Alikvoty). Na obrazovce AssayManager se zobrazí seznam s podrobnostmi o alikvotu. Tento seznam představuje předpokládané obsazení rotoru.

- 1i. Do tohoto seznamu zadejte identifikační čísla alikvotů, jakož i jakékoli volitelné informace o alikvotu jako komentář ke každému alikvotu.
- 1j. Vyberte krok Properties (Vlastnosti) a zadejte název pracovního seznamu (obrázek 2).

Obrázek 2. Vlastnosti.

- 1k. Potvrďte zaškrtnovací políčko is applicable (vztahuje se) a klikněte na tlačítko Apply (Použít).
- 1l. Uložte pracovní seznam.
Lze vytisknout pracovní seznam, který může pomoci s přípravou a nastavením PCR. Chcete-li vytisknout pracovní seznam, klikněte na Print work list (Tisk pracovního seznamu). Podrobnosti o alikvotech jsou součástí tohoto pracovního seznamu.

Poznámka: Pracovní seznam lze vytvořit, jakmile je cyklus nastaven v přístroji, nebo je možné pracovní seznam uložit před přidáním alikvotů do přístroje.

2. Nastavte běh zpracování QIASure.

Pro minimalizaci rizika kontaminace při reakci PCR se důrazně doporučuje používat PCR skříň s možností UV záření.

Dávkování směsi QIASure Master Mix musí být provedeno v oblasti oddělené od oblasti, kde se provádí reakce konverze DNA hydrogensířičitanem.

Pro zabránění kontaminace templátu nebo nukleázy před použitím roztoku k degradaci DNA očistěte prostor stolu, pipety i stojan na zkumavky.

Poznámka: Mezi každým použitím ve zkumavce vyměňujte špičky, aby se zabránilo jakékoli nespecifické kontaminaci templátu nebo reakční směsi, která by mohla vést k falešně pozitivním výsledkům.

2a. Zcela rozmrazte směs QIASure Master Mix a kalibrátor QIASure Calibrator.

Chraňte směs QIASure Master Mix před světlem, kdykoli je to možné.

Poznámka: Nepřekračujte 30 minut pro krok rozmrazování, aby nedošlo k degradaci materiálu.

2b. Jemně promíchejte vzorky tím, že je 10krát převrátíte, poté je před použitím krátce odstředíte.

2c. Do příslušných zkumavek ve stripu nadávkujte 17,5 µl směsi QIASure Master Mix připravené k použití. Příprava reakce může být prováděna při pokojové teplotě.

2d. Směs QIASure Master Mix vraťte do mrazničky, aby se zabránilo jakékoli degradaci materiálu.

2e. Zkumavky přeneste do oddělené oblasti a nadávkujte kontroly analýzy a alikvoty konvertované hydrogensířičitanem.

2f. Přidejte 2,5 µl vody do beztemplátové kontroly (No Template Control, NTC) na pozici 2 (viz tabulka 1 výše). Opatrně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

2g. Přidejte 2,5 µl kalibrátoru QIASure Calibrator na pozici 1 (viz tabulka 1 výše). Opatrně promíchejte pipetováním nahoru a dolů a zkumavku opatřete uzávěrem.

2h. Do odpovídající zkumavky přidejte 2,5 µl DNA konvertované hydrogensířičitanem. Opatrně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

2i. Jakmile jste naplnili sadu 4 zkumavek, uzavřete je.

Poznámka: Zkumavky PCR lze mezi pipetováním alikvotů do zkumavek PCR a zahájením experimentu ve stroji skladovat po dobu 30 minut v temnu při teplotě 2–8 °C.

2j. Kalibrátor QIASure Calibrator vraťte do mrazničky, aby se zabránilo jakékoli degradaci materiálu.

Poznámka: Mezi každým použitím ve zkumavce vyměňujte špičky, aby se zabránilo jakékoli nespecifické kontaminaci templátu nebo reakční směsi, která by mohla vést k falešně pozitivním výsledkům.

3. Připravte přístroj Rotor-Gene Q MDx a následujícím způsobem zahajte běh (experiment):

- 3a. Rotor se 72 jamkami umístěte do držáku rotoru.
- 3b. Vložte stripy se zkumavkami na přiřazené pozice v rotoru; začněte pozicí 1, jak ukazuje tabulka 1; do všech nevyužitých pozic vložte prázdné zkumavky uzavřené víčky.

Poznámka: Ověřte, že je první zkumavka vložena do pozice 1 a stripy se zkumavkami jsou umístěny ve správných pozicích a orientaci, jak ukazuje tabulka 1.

- 3c. Nasaďte pojistný kroužek.
- 3d. Vložte rotor s pojistným kroužkem do přístroje Rotor-Gene Q MDx a zavřete víko přístroje.
- 3e. V softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0 vyberte buď příslušný pracovní seznam ze správce pracovních seznamů a klikněte na tlačítko Apply (Použít), nebo – pokud je pracovní seznam stále otevřený – klikněte na tlačítko Apply (Použít).

Poznámka: Pokud nebyl pracovní seznam pro cyklus dosud vytvořen, přihlaste se do softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0 a předtím, než budete pokračovat, postupujte podle kroku 1.

- 3f. Vložte název běhu zpracování (experimentu).
- 3g. V položce Cycler selection (Výběr cykleru) vyberte cykler, který chcete použít.
- 3h. Zkontrolujte správné připojení pojistného kroužku a potvrďte na obrazovce, že pojistný kroužek je správně nasazen.
- 3i. Klikněte na Start experiment (Zahájit experiment).
Měl by se spustit test QIASure Methylation Test.

4. Po proběhnutí cyklu klikněte na Finish run (Dokončit cyklus).

5. Uvolněte a schvalte cyklus.

- Uživatel, který je přihlášen jako „Approver“ (Schvalovatel), klikne na Release and go to approval (Uvolnit a přejít ke schválení).
- Uživatel, který je přihlášen jako „Operator“ (Obsluha), klikne na Release (Uvolnit).

6. Uvolněte výsledky.

- Pokud kliknete na Release and go to approval (Uvolnit a přejít ke schválení), zobrazí se výsledky experimentu.
- Pokud uživatel přihlášený s uživatelskou rolí klikne na Release (Uvolnit), musí se někdo přihlásit jako „Approver“ (Schvalovatel) a vybrat prostředí Approval (Schválení).
- Vyfiltrujte analýzu, která má být schválena výběrem možností filtru a kliknutím na Apply (Použít).
- Zkontrolujte výsledky a schvalte výsledky každého alikvotu testu.

V tabulce „Results“ (Výsledky) zobrazte rolováním alikvot, který má být schválen.

Každý výsledek alikvotu, který má být schválen, má tři přepínače na konci vyhrazeného řádku.

Výsledek alikvotu buď přijměte, nebo odmítněte.

Poznámka: Výsledek, který byl automaticky nastaven softwarem Rotor-Gene AssayManager na INVALID (NEPLATNÝ), nelze již nikdy převést na platný výsledek, a to ani v případě, že je výsledek odmítnut.

Volitelné: Do sloupce Sample comment (Komentář alikvotu) zadejte komentář.

- Klikněte na Release/Report data (Uvolnit/vykazovat data).
- Klikněte na OK (OK). Zpráva bude vytvořena ve formátu přenosného dokumentu (.pdf) a automaticky uložena v předem definované složce. Ve výchozím nastavení je umístění složky: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Soubory sestavy)

Poznámka: Složku i její umístění lze změnit v prostředí „Configuration“ (Konfigurace).

- Přejděte na kartu Archive (Archiv) a exportujte soubor .rex odpovídající nezpracovanými údaji. Vyhledejte svůj experiment pomocí možností filtru a klikněte na Show Assays (Zobrazit analýzy). Poté klikněte na Export .rex file (Exportovat soubor .rex) a uložte jej kliknutím na OK (OK). Software automaticky uloží soubor .rex do následující předem definované složky: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments** (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experimenty)

Poznámka: Toto umístění a složku lze změnit na kartě Specify the .rex file export destination (Specifikovat cílové umístění exportu souboru .rex).

Poznámka: Pro účely řešení potíží je vyžadován podpůrný balíček zpracování testu. Podpůrné balíčky lze vytvořit v prostředí schválení nebo archivu. Viz uživatelská příručka *Rotor-Gene AssayManager Core Application*, řešení potíží, pokyny „Creating a support package“ (Vytvoření balíčku podpory) na stránkách <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Kromě podpůrného balíčku může být nápomocná také auditová stopa z doby ± 1 den kolem času, kdy došlo k danému incidentu. Auditovou stopu lze vyhledat v prostředí Service (Servis) (*uživatelská příručka Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Vyjměte zkumavky z přístroje Rotor-Gene Q MDx a zlikvidujte stripy se zkumavkami v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Interpretace výsledků

Analýza je zcela automatizovaná.

Software Rotor-Gene AssayManager v1.0 nejdříve analyzuje amplifikační křivky a může označit neshodné křivky jako neplatné podle toho, jaký mají tvar a jaká je amplituda šumu. Pokud se to stane, bude zneplatněná křivka označena příznakem (viz tabulka 2).

Software Rotor-Gene AssayManager v1.0 poté provede analýzu kontrol běhu.

- Kalibrátor
- NTC

Poznámka: Soubor sestavy generovaný na konci běhu ukazuje výsledky získané pomocí kontrol běhu s příznaky neplatnosti před neplatnými daty.

Pokud všechny kontroly běhu vyhovují, potom software Rotor-Gene AssayManager provede analýzu neznámých alikvotů.

Tabulka 2 znázorňuje příznaky neplatnosti alikvotů, které mohou být přiřazeny jednotlivé zkumavce během analýzy prováděné softwarem Rotor-Gene AssayManager v1.0 souběžně s vysvětlením, co tyto příznaky znamenají.

Tabulka 2. Příznaky neplatnosti alikvotů a popis podmínek

Příznak	Chování	Popis
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Neplatné	Cílová hodnota je vyšší než definovaný rozsah. Může se jednat o C_T , koncovou fluorescenci, koncentraci nebo vypočítanou hodnotu, např. C_T či ΔC_T .
ASSAY_INVALID	Neplatné	Analýza je neplatná, protože je neplatná nejméně jedna externí kontrola.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Neplatné	Cílová hodnota je nižší než definovaný rozsah. Může se jednat o C_T , koncovou fluorescenci, koncentraci nebo vypočítanou hodnotu, např. C_T či ΔC_T .
CONSECUTIVE_FAULT	Neplatné	Cíl, který byl použit pro výpočet tohoto cíle, je neplatný.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Neplatné	Amplifikační křivka z nezpracovaných dat vykazuje tvar, který se vymyká standardnímu chování této analýzy. Existuje vysoká pravděpodobnost nesprávných výsledků nebo chybné interpretace výsledků.
FLAT_BUMP	Neplatné	Amplifikační křivka z nezpracovaných dat vykazuje tvar jako zploštělý hrbol, který se vymyká standardnímu chování této analýzy. Existuje vysoká pravděpodobnost nesprávných výsledků nebo chybné interpretace výsledků (např. chybně určená hodnota C_T).
IN_ACCEPTED_RANGE	Platné	NTC zobrazuje signální hodnoty C_T nad 36 pro cílovou hodnotu ACTB.
INVALID_CALCULATION	Neplatné	Chyba výpočtu pro tento cíl.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Neplatné	Amplifikační křivka překračuje prahovou hodnotu více než jedenkrát. Nelze určit jednoznačnou hodnotu C_T .
NO_BASELINE	Neplatné	Nenalezena počáteční hodnota pro počáteční základní linii.
NO_CT_DETECTED	Proměnná	Pro tento cíl není určena žádná C_T .
NO_VALUE	Neplatné	Cíl nemá žádnou hodnotu, ale očekává se, že nějakou bude mít. Tato hodnota nemusí být v konkrétním rozsahu. Může se jednat o C_T koncovou fluorescenci, koncentraci nebo vypočítanou hodnotu (např. C_T či ΔC_T).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Varování	Odchylka během normalizačního postupu. Amplifikační křivka je zobrazena s výchozí normalizací, správnost výsledků je zapotřebí zkontrolovat ručně.
OTHER_TARGET_INVALID	Neplatné	Další cíl pro stejný alikvot je neplatný.

Tabulka 2. Příznaky neplatnosti alikvotů a popis podmínek

SATURATION	Neplatné	Fluorescence z nezpracovaných dat je silně saturovaná před inflekčním bodem amplifikační křivky.
SATURATION_IN_PLATEAU	Varování	Fluorescence nezpracovaných dat se saturuje před fází plató amplifikační křivky.
SPIKE	Varování	U fluorescence z nezpracovaných dat je zjištěn ostrý nárůst v amplifikační křivce, ale mimo oblast, kde se určuje C_T .
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Neplatné	V amplifikační křivce je zjištěn ostrý nárůst blízko C_T .
STEEP_BASELINE	Neplatné	V amplifikační křivce pro fluorescenci z nezpracovaných dat je zjištěna strmě stoupající základní linie.
STRONG_BASELINE_DIP	Neplatné	V amplifikační křivce pro fluorescenci z nezpracovaných dat je zjištěn strmý pokles základní linie.
STRONG_NOISE	Neplatné	Silný šum je zjištěn mimo růstovou fázi amplifikační křivky.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Neplatné	Silný šum je zjištěn v růstové (exponenciální) fázi amplifikační křivky.
UNCERTAIN	Proměnná	Výsledky z automatického skenování dat (AUDAS) jsou v nesouladu s výsledky ze základní analýzy. Není možné provést jednoznačné automatické vyhodnocení dat.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Proměnná	Pro cíl, který by se neměl amplifikovat, byla detekována hodnota C_T .
UNEXPECTED_VALUE	Neplatné	Cíl má hodnotu, ale nejedná se o očekávanou hodnotu. Může se jednat o C_T , koncovou fluorescenci, koncentraci nebo vypočítanou hodnotu, např. C_T či ΔC_T .
UPSTREAM	Proměnná	Status alikvotu byl nastaven na Invalid (Neplatný) nebo Unclear (Nejasný) procesem v předchozích krocích (např. QIAasympy). Poznámka: U alikvotů, které jsou označeny jako nejasné, je chování softwaru Rotor-Gene AssayManager definováno v prostředí „Configuration“ (Konfigurace) softwaru AssayManager. Příznaky „Neplatné“ z procesů v předchozích krocích vždy vedou k neplatnému odpovídajícímu alikvotu v systému Rotor-Gene AssayManager.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Neplatné	V amplifikační křivce pro fluorescenci z nezpracovaných dat je zjištěna kolísající základní linie.

- Pokud jsou všechny kontroly v běhu platné, potom software Rotor-Gene AssayManager v1.0 provede analýzu neznámých alikvotů. V alikvotu musí být přítomno minimální množství DNA konvertované hydrogensiřičitanem, aby byly výsledky interpretovány. To je indikováno hodnotou C_T housekeeping genu ACTB, která musí být $\leq 26,4$, aby byl alikvot softwarem Rotor-Gene AssayManager validován.
- Poté budou vypočteny hodnoty $\Delta\Delta C_T$ pro *FAM19A4* a *hsa-mir124-2* a bude stanoven výsledek. Pokud je hodnota $\Delta\Delta C_T$ pod mezní hodnotou, je cíl hodnocen jako „Hypermethylation positive“ (Hypermethylace pozitivní).
Poznámka: Částečné nebo nízké úrovně metylace jsou přirozeně vyskytující se jevy, které na rozdíl od hladin hypermethylace přímo nesouvisejí s rozvojem rakoviny.
- Alikvot je považován za „Hypermethylation positive“ (Hypermethylace pozitivní), pokud je alespoň jeden z cílů hodnocen jako „Hypermethylation positive“ (Hypermethylace pozitivní).
- Alikvoty s nízkou kvalitou/kvantitou DNA (tj. hodnoty ACTB C_T hraničně splňující parametry přijatelnosti, hodnoty C_T od 25 do 26,4) mohou být hodnoceny jako falešně negativní. Je doporučeno provádět opakování testování PCR. Negativní výsledek u opakovaného testování znamená, že je u alikvotu hypermethylace negativní; pozitivní výsledek znamená, že je u alikvotu hypermethylace pozitivní.
- U alikvotů s vysokou celularitou, které jsou zpracovávány protokolem přímé konverze, existuje riziko přetížení reakce PCR DNA, což může vést k falešně negativnímu výsledku pro cíl FAM19A4. Proto se u alikvotů s 1) negativním výsledkem hypermethylace, 2) hodnotou C_T ACTB ≤ 23 a 3) hodnotou $\Delta\Delta C_T$ FAM19A4 mezi 10,36 a 11,36 doporučuje opakovat PCR s pětinasobně menším vstupem konvertované DNA, a to zředěním alikvotu ve vodě.

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědečtí pracovníci, kteří pracují v technických službách společnosti QIAGEN, vám vždy ochotně odpoví na jakékoli dotazy týkající se informací či protokolů v této příručce nebo technologií přípravy alikvotů či zpracování analýz (kontaktní informace najdete na zadní straně obálky nebo na stránkách www.qiagen.com).

Informace o řešení potíží souvisejících se systémem Rotor-Gene AssayManager naleznete v uživatelské příručce *Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Komentáře a návrhy

Všeobecné nakládání

Koncentrace DNA alikvotu je příliš nízká pro konverzi hydrogensířičitanem

Zkontrolujte extrakt DNA

Opakujte extrakci DNA s koncentrovanějším klinickým alikvotem.

Alikvot je vyhodnocen jako neplatný: amplifikace ACTB je příliš nízká nebo chybí

a) Chyba pipetování nebo vynechaná činidla

Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce. Zopakujte cyklus PCR.

b) Zkontrolujte koncentrát DNA

Zvyšte vstupní množství DNA pro konverzi hydrogensířičitanem na maximum. Reakce konverze hydrogensířičitanem má optimální výkonnost pro vstup DNA v rozsahu od 100 ng do 2 µg.

c) U protokolu „Bisulfite-conversion directly on cervical specimen“ (Konverze hydrogensířičitanem přímo na cervikálním vzorku) zkontrolujte celularitu klinického vzorku

Opakujte reakci konverzi hydrogensířičitanem s 10 % cervikálního vzorku v odběrovém médiu PreservCyt (tj. 2 ml z 20 ml).

d) Zkontrolujte eluát konvertovaný hydrogensířičitanem

V případě potřeby vyššího vstupního množství DNA lze konverzi hydrogensířičitanem opakovat.

Alikvot je hodnocen jako neplatný: cíle FAM19A4 a/nebo hsa-mir124-2 jsou neplatné

Nedostatečné míchání

Alikvot a reakční směs promíchejte pipetováním (přibližně 10x každou zkumavku). Opakujte zpracování alikvotu.

Komentáře a návrhy

Pozitivní kontrola je hodnocena jako neplatná: amplifikace je příliš nízká nebo pro jeden či více cílů chybí

a) Chyba pipetování nebo vynechaná činidla	Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce. Zopakujte cyklus PCR.
b) Částečná degradace	Uchovávejte obsah soupravy při teplotě –30 až –15 °C. Opakované zmrazení a rozmrazení je povoleno maximálně po tři cykly.
c) Činidla PCR částečně degradovaná	Uchovávejte součásti soupravy při teplotě –30 až –15 °C a reakční směsi chraňte před světlem. Zabraňte opakovanému zmrazení a rozmrazení.
d) Obrácení stripu	Zkontrolujte postup pipetování a nastavení reakce.
e) Datum použitelnosti	Zkontrolujte datum použitelnosti použité soupravy.
f) Časová prodleva mezi pipetováním alikvotů a zahájením cyklu	Reakční směs PCR lze uchovávat při teplotě 2–8 °C po dobu 30 minut ve tmě mezi dávkováním alikvotů do reakcí PCR a spuštěním cyklu na přístroji.

Beztemplátová kontrola (no template control, NTC) je neplatná

a) Chyba pipetování	Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce. Zopakujte cyklus PCR.
b) Křížová kontaminace	Vyměňte všechna kriticky důležitá činidla. S alikvoty, součástmi soupravy a spotřebním materiálem vždy zacházejte v souladu s běžně přijímanou praxí k zabránění přenosu kontaminace.
c) Kontaminace činidel	Vyměňte všechna kriticky důležitá činidla. S alikvoty, součástmi soupravy a spotřebním materiálem vždy zacházejte v souladu s běžně přijímanou praxí k zabránění přenosu kontaminace.
d) Obrácení stripu	Zkontrolujte postup pipetování a nastavení reakce.
e) Časová prodleva mezi pipetováním alikvotů a zahájením cyklu	Reakční směs PCR lze uchovávat při teplotě 2–8 °C po dobu 30 minut ve tmě mezi dávkováním alikvotů do reakcí PCR a spuštěním cyklu na přístroji.
f) Zhoršení kvality sondy	Reakční směs uchovávejte mimo dosah světla. Zkontrolujte falešně pozitivní na fluorescenční křivce.

Nepřítomný nebo slabý signál u alikvotu, avšak kontroly jsou v pořádku

a) Inhibiční vlivy	Vždy zkontrolujte, že se na pufru ve filtru nevyskytují po odstředování při konverzi hydrogensířičitanem žádné zbytky. Opakujte konverzi hydrogensířičitanem.
b) Chyba pipetování	Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce. Zopakujte cyklus PCR.

Pokud chyba přetrvává, kontaktujte technickou podporu společnosti QIAGEN.

Omezení

Činidla testu QIASure Methylation Test se smí používat výhradně pro diagnostiku in-vitro.

Použití testů PCR vyžaduje správnou laboratorní praxi, včetně údržby vybavení, které je určeno pro molekulární biologii a splňuje příslušné předpisy a normy.

Činidla a pokyny dodané s touto soupravou byly validovány pro zajištění optimálního výkonu.

Test QIASure Methylation Test smí být používán laboranty vyškolenými v použití přístrojů Rotor-Gene Q MDx a softwaru Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Produkt smějí používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v technikách real-time PCR a postupech diagnostiky in vitro. Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů.

Pro dosažení optimálních výsledků PCR je nutné přísně dodržovat pokyny v návodu pro uživatele (příručka).

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Komponenty po datu použitelnosti nepoužívejte.

Alikvoty s nízkou kvalitou/kvantitou DNA (tj. hodnoty ACTB C_T hraničně splňující parametry přijatelnosti, hodnoty C_T od 25 do 26,4) mohou být hodnoceny jako falešně negativní. Je doporučeno provádět opakování samostatných testů. Negativní výsledek u opakovaného testování znamená, že je u alikvotu hypermetylace negativní; pozitivní výsledek znamená, že je u alikvotu hypermetylace pozitivní.

Všechna reakční činidla dodávaná v testu QIASure Methylation Test jsou určena k použití výhradně s ostatními činidly dodanými ve stejné soupravě. Jinak to může mít vliv na funkční vlastnosti.

Test QIASure Methylation Test je validován pro HPV pozitivní ženy.

Test QIASure Methylation Test je validován pro cervikální vzorky odebrané a skladované v médiu PreservCyt, SurePath™ nebo STM a pro vzorky ze samoodběru vaginálním kartáčkem, uložené až do dodání do laboratoře v roztoku PreservCyt.

Pro použití s analýzou PCR s testem QIASure Methylation Test byl validován pouze přístroj Rotor-Gene Q MDx.

Jakékoli jiné než určené použití tohoto výrobku a/nebo úprava součástí zneplatní záruku společnosti Self-screen B.V.

Každý uživatel je zodpovědný za validaci funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností výrobků Self-screen.

Charakteristika funkčních vlastností

Limit detekce (Limit of Detection, LOD)

Analytická citlivost testu QIASure Methylation Test byla stanovena jako 95 % limit detekce (95 % LOD) s použitím řady sériových ředění plazmidu obsahujícího všechny tři amplikonové sekvence (tj. *ACTB*, *FAM19A4* a *hsa-mir124-2*; rozmezí 750 000 až 0,25 kopií na PCR). 95 % LOD pro cíle bylo vyhodnoceno jako nejnižší zředění plazmidu poskytující alespoň 35 z 36 pozitivních výsledků ($C_T < 40$). Celkem bylo provedeno 12 experimentů čtyřmi různými operátory (1 běh zpracování na operátora za den) s použitím tří různých šarží a tří různých systémů RGQ. Každý experiment zahrnoval trojnásobné testování 11 ředění plazmidu. 95 % LOD byl pro všechny tři různé cíle 7,5 kopií na PCR.

Linearita

Linearita analýzy QIASure byla stanovena na základě údajů z 12 experimentů, které byly provedeny pro hodnocení 95 % LOD. Dva cíle, *FAM19A4* a *hsa-mir124-2*, a referenční *ACTB* mají lineární amplifikaci od 750 000 do 7,5 kopií na PCR.

Přesnost

Přesnost testu QIASure Methylation Test byla stanovena jako variabilita v rámci jedné analýzy (variabilita více výsledků alikvotů se stejnou koncentrací v rámci jednoho experimentu) a celková variabilita analýzy (variabilita více výsledků analýzy generované různými operátory, na různých přístrojích, s různými šaržemi, v různých laboratořích). Testování bylo prováděno na DNA konvertované hydrogensiřičitanem, získané ze vzorku z děložního čípku s vysokým rizikem HPV positivity, který testoval pozitivní hypermetylaci pomocí signálů pro *FAM19A4* a *hsa-mir124-2*, což odpovídá přibližně trojnásobku hodnoty LOD koncentrace. Testování bylo realizováno ve dvou opakováních v osmi cyklech prováděných čtyřmi různými operátory (jeden běh na operátora za den) pomocí dvou různých šarží a tří různých přístrojů RGQ ve dvou různých laboratořích, čímž vzniklo 16 datových bodů na alikvot. Koeficient variace (CV) byl stanoven pro hodnoty C_T a $\Delta\Delta C_T$ (tabulka 3).

Tabulka 3. CV (%) pro hodnoty C_T a $\Delta\Delta C_T$ v alikvotu z děložního čípku s pozitivní metylací

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

Celkový statistický rozptyl v hodnotách C_T alikvotu se zmíněnou koncentrací je 1,32 % pro interní kontrolu kvality alikvotu (ACTB), 1,52 % pro *FAM19A4* a 1,64 % pro *hsa-mir124-2*. Celkový statistický rozptyl v hodnotách $\Delta\Delta C_T$ alikvotu s uvedenou koncentrací je 5,97 % pro *FAM19A4* a 5,75 % pro *hsa-mir124-2*.

Interferující látky

Inhibičními látkami vybranými pro svůj potenciální účinek na PCR byl desulfonační a promývací pufr soupravy pro konverzi hydrogensířičitanem. Látky potenciálně přítomné v původním alikvotu nebyly testovány vzhledem ke skutečnosti, že alikvot DNA je dvakrát čištěn křemennými kuličkami, tj. extrakce DNA z původního alikvotu a čištění DNA po konverzi hydrogensířičitanem. Stopy desulfonačního a promývacího pufru vykazovaly interferenci v PCR, která byla detekována neplatným výsledkem testu pro interní kontrolu kvality alikvotu.

Klinická účinnost

HPV pozitivní vzorky z děložního čípku*

Klinická účinnost testu QIASure Methylation Test pro cervikální intraepiteliální neoplazii stupně 3 (CIN 3) a karcinom děložního čípku (tj. CIN 3+) byla hodnocena v multicentrické retrospektivní studii v EU (13). Test QIASure Methylation Test byl hodnocen u 2 384 HPV pozitivních screeningových alikvotů z děložního čípku žen (ve věku 29–76 let) ze čtyř zemí EU (Skotsko, Slovinsko, Dánsko, Nizozemsko) (13). Vzorky byly odebrány do médií PreservCyt nebo SurePath. Populace studie zahrnovala 2 012 žen bez známek onemocnění během 2 let sledování (zkráceně $\leq$ CIN 1), 124 žen s CIN 2, 228 žen s CIN 3 a 20 žen s karcinomem. DNA bylo extrahováno ze alikvotů z děložního čípku a 250 ng DNA bylo použito pro vstup do reakce konverze hydrogensířičitanem (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Z 250 ng modifikované DNA bylo 20 % použito v rámci PCR (což odpovídá 50 ng původní cílové DNA/PCR). Celkové míry positivity pro míry positivity testu QIASure Methylation Test stratifikované podle klinického cílového parametru jsou uvedeny níže (tabulka 4).

Tabulka 4. Míry positivity testu QIASure Methylation Test

Klinický cílový parametr	Frakce	Míra positivity (95 % 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)
Karcinom děložního čípku	19/20	95,0 % (70,7–99,3)

U alikvotů děložního čípku s vysokým rizikem HPV positivity je citlivost u CIN 3+ 78,6 % (195/248; 95 % CI: 73,1–88,3) a celková specifita testu QIASure Methylation Test byla 78,3 % (n = 2 013; 95 % CI: 76–80). Negativní prediktivní hodnota hrHPV pozitivních, výsledků s negativní metylací byla 99,9 % pro karcinom děložního čípku (N = 1 694; 95 % CI: 99,6–99,99), 96,9 % pro CIN 3+ (95 % CI: 96–98), a 93,0 % pro CIN 2+ (95 % CI: 92–94).

Kromě toho byla citlivost pro karcinom děložního čípku hodnocena v multicentrické celosvětové retrospektivní studii na 519 invazivních karcinomech s různými histotypy z více

* Lékařem odebrané vzorky z děložního čípku.

než 25 zemí (11). DNA bylo extrahováno ze alikvotů z děložního čípku a 250 ng DNA bylo použito pro vstup do reakce konverze hydrogensířičitanem (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Z 250 ng modifikované DNA bylo 20 % použito v rámci PCR (což odpovídá 50 ng původní cílové DNA/PCR). 510 z 519 karcinomů bylo testem QIASure Methylation Test stanoveno jako pozitivní, takže míra positivity činila 98,3 % (95 % CI: 96,7–99,2), míry positivity stratifikované podle histotypů uvádí Tabulka 5. Míra positivity testu QIASure Methylation Test ve vzorcích karcinomu děložního čípku.

Tabulka 5. Míra positivity testu QIASure Methylation Test ve vzorcích karcinomu děložního čípku

Klinický cílový parametr	Frakce	Míra positivity (95 % CI)
Spinocelulární karcinom	313/318	98,4 % (96,4–99,5)
Adenokarcinom	121/123	98,4 % (94,2–99,8)
Karcinom z adenoskvamózních buněk	42/42	100,0 % (91,6–100)
Vzácné histotypy karcinomů	30/32	93,8 % (79,2–99,2)
Histotyp karcinomu není specifikován	4/4	100 % (39,8–100,0)

HPV pozitivní vlastní vzorky z odběru vaginálním kartáčkem

Klinická účinnost testu QIASure Methylation Test pro vlastní vzorky z vaginálního kartáčku pro účely detekce cervikálních intraepiteliálních neoplazií stupně 3 a rakoviny děložního čípku (tj. CIN 3+) byla hodnocena testováním 247 vaginálních vzorků s vysokým rizikem positivity HPV. U 14 alikvotů (5,7 %) byly hodnoty ACTB $C_T > 26,4$ a ty byly následně hodnoceny jako neplatné. Alikvoty s platnými výsledky testu zahrnovaly 148 vlastních alikvotů z kartáčku u žen s $\leq$ CIN 1 po 18 měsících sledování, 24 s CIN 2, 50 s CIN 3, 8 se spinocelulárním karcinomem a 3 s adenokarcinomem. DNA byla extrahována z vaginálních vzorků a 250 ng DNA bylo použito pro vstup do reakce konverze hydrogensířičitanem (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Z 250 ng DNA konvertované hydrogensířičitanem bylo 20 % použito v PCR (což odpovídá 50 ng původní cílové DNA/PCR). Míry positivity testu QIASure Methylation Test stratifikované podle klinického cílového parametru jsou uvedeny níže (tabulka 6).

Tabulka 6. Míry pozitivitativity testu QIASure Methylation Test u vzorků ze samoodběru vaginálním kartáčkem

Klinický cílový parametr	Frakce	Míra pozitivitativity (95 % CI)
≤ CIN 1	34/148	23,0 % (16,9–30,4)
CIN 2	7/24	29,2 % (14,6–49,8)
CIN 3	33/50	66,0 % (52,0–77,7)
Karcinom skvamózních buněk	8/8	100,0 % (63,1–100,0)
Adenokarcinom	3/3	100,0 % (29,2–100,0)

Mezi vlastními vzorky z vaginálního kartáčku s vysokými rizikem pozitivitativity HPV je citlivost u CIN 3+ 72,1 % (44/61; 95 % CI: 59,7–81,9) a u karcinomu 100 % (11/11; 95 %CI: 72–100).*

Výkon *FAM19A4* a *hsa-mir124-2* pro detekci pokročilých transformujících CIN lézí

Analýza metylace promotoru hostitelské buňky specificky detekuje tzv. „pokročilé“ léze CIN, které nesou profil metylace způsobený rakovinou a mají očekávané vysoké krátkodobé riziko progresu k rakovině (7, 8). Výkon analýzy hypermethylace promotoru *FAM19A4* a *hsa-mir124-2* byl hodnocen testováním 29 vzorků s vysokým rizikem HPV pozitivitativity u žen s pokročilými transformujícími CIN 2/3 a 19 vzorků s vysokým rizikem HPV pozitivitativity u žen s časně transformujícími CIN 2/3. Methylace byla zvláště spojena s pokročilou fází onemocnění a hodnotila všechny pokročilé léze CIN2/3 (100 %; 29/29; 95 % CI: 88–100) s pozitivní hypermethylací ve srovnání se 47 % (9/19; 95 % CI: 27–69) časných lézí CIN 2/3.

* Poznámka: Hypermethylace cílů v alikvotech žen, které mají pokročilé CIN léze a/nebo rakovinu děložního čípku, může zůstat nezjištěná kvůli variabilitě odběru vzorků, například v důsledku nedostatečného odběru vzorků.

Robustnost

Robustnost testu QIASure Methylation Test byla stanovena jako shoda mezi výstupem analýzy QIASure Methylation Test a verzí analýzy Research Use Only (RUO). Testování bylo prováděno na genomové DNA konvertované hydrogensiřičitanem, získané z 10 alikvotů děložního čípku s vysokým rizikem HPV positivity, z nichž 5 bylo dříve identifikováno jako s vzorky s negativní hypermetylací pro oba markery a 5 jako vzorky s pozitivní metylací (např. alespoň pro 1 ze 2 markerů). Testování bylo realizováno ve dvou opakováních v 8 cyklech čtyřmi různými operátory (jeden cyklus na operátora za den) pomocí dvou různých šarží a tří různých přístrojů Rotor-Gene Q MDx ve dvou různých laboratořích. Pro každý alikvot bylo získáno celkem 16 datových bodů (tabulka 7).

Tabulka 7. Shoda analýzy QIASure Methylation Test a verze RUO analýzy

Číslo vzorku	Výsledek RUO	Shoda Lab 1 ve srovnání s RUO	Shoda Lab 2 ve srovnání s 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)
Mezisosčet		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)
Mezisosčet		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Čtyři z pěti alikvotů, které byly dříve identifikovány jako vzorky s negativní metylací, prokázaly 100 % shodu při použití testu QIASure Methylation Test v obou laboratořích. Alikvot 3 vykazoval v obou laboratořích shodu 62,5 % (5/8). Pozorovaná variace související s hladinami *FAM19A4* kolem mezní hodnoty analýzy. Celková shoda mezi alikvoty s negativní metylací byla 92,5 % (37/40).

U všech 5 alikvotů dříve identifikovaných jako vzorky s pozitivní metylací se prokázala 100 % shoda s referenční analýzou, takže celková shoda byla 100 % (40/40).

Konverze hydrogensířičitanem přímo u vzorků děložního čípku

Protokol „Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit“ (Konverze hydrogensířičitanem přímo na cervikálních vzorcích pomocí soupravy EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit) byl ověřen oproti referenčnímu protokolu (tj. konverze hydrogensířičitanem s předchozí kontrolou množství DNA v alikvotu) na 119 cervikálních stěrech a následným testem QIASure Methylation Test. Míra úspěšnosti konverze hydrogensířičitanem přímo u alikvotů děložního čípku s použitím vstupu 2,5 % cervikálního vzorku byla 95,8 % (114/119) a zvýšila se na 100 % po opakovaném testování neplatných vzorků s 10 % vzorků děložního čípku. Shoda ve výsledku testu QIASure Methylation Test mezi protokoly konverze hydrogensířičitanem byla 90,8 % (108/119; hodnota kappa 0,75).

Protokol „Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the QIASymphony Bisulfite Kit“ (Konverze hydrogensířičitanem přímo na cervikálních vzorcích pomocí soupravy QIASymphony Bisulfite Kit) byl ověřen oproti referenčnímu protokolu (tj. konverze hydrogensířičitanem s předchozí kontrolou množství DNA v alikvotu) na 120 cervikálních stěrech a následným testem QIASure Methylation Test. Míra úspěšnosti konverze hydrogensířičitanem přímo u alikvotů děložního čípku s použitím vstupu 2,5 % cervikálního vzorku byla 94,2 % (113/120) ve srovnání s mírou 97,5 % (117/120) získanou referenčním protokolem. Shoda ve výsledku testu QIASure Methylation Test mezi protokoly konverze hydrogensířičitanem byla 94,7 % (107/113; hodnota 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

Symboly

Na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
	Použijte do
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Symbol CE-IVD
	Obsahuje dostatek činidel pro <N> reakcí
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
Rn	R označuje revizi návodu k použití (příručky) a n je číslo revize
	Globální číslo obchodní položky
	Teplotní omezení
	Výrobce
	Chraňte před světlem



Viz návod k použití



Upozornění

Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na internetové adrese www.qiagen.com/Support, volejte na telefonní číslo 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN anebo místní distributory (viz zadní strana obalu nebo navštivte webové stránky www.qiagen.com).

Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
QIASure Methylation Test Kit	Pro 72 reakcí: 2 master mixy, 2 kalibrátory.	616014
QIAAsymphony SP	Modul pro přípravu alikvotů QIAAsymphony: zahrnuje roční záruku na všechny části a provedení (volitelné pro automatickou extrakci)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler pro real-time PCR a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, karmínový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na části a provedení, instalaci a školení	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler pro real-time PCR a analyzátor High Resolution Melt s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus kanál HRM, notebook, software, příslušenství: zahrnuje roční záruku na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty	9002032
Příslušenství přístroje Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Hliníkový blok pro manuální nastavení reakce pomocí jednonábové pipety s využitím zkumavek 72 × 0,1 ml	9018901

Produkt	Obsah	Kat. č.
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s uzávěry, pro 1 000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10× 250 stripů po 4 zkumavkách a víčka na 10 000 reakcí	981106
Rotor-Gene AssayManager – pro běžné testování pomocí přístrojů		
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene AssayManager	Software pro běžné testování s přístroji Rotor-Gene Q and QIAsymphony RGQ; samostatná licence pro instalaci softwaru na jednom počítači	9022739

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce soupravy QIAGEN nebo v uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technické podpory společnosti QIAGEN či místního distributora.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná.

Historie revizí dokumentu

Datum	Změny
R4, červen 2019	Revidovaný vývojový diagram pracovního postupu v části „Princip a postup testu“; Přidána souprava EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit do části „Materiály, které nejsou součástí dodávky“; Revidovaný obsah okna s informacemi o bezpečnosti; Přidány informace o zahřívacím běhu pro RGQ MDx 5-plex HRM; Revidovaná část „Příprava alikvotu“; Přidána další položka do části „Řešení potíží“; Přidáno téma konverze hydrogensulfiditarem přímo k vzorkům děložního čípku v části „Charakteristiky funkčních vlastností“; Aktualizovaná část „Literatura“; Aktualizace rozvržení
R5, červenec 2023	Přidána instrumentace QIASymphony pro volitelnou automatizaci extrakce a souprava QIASymphony Bisulfite Kit v oddíle Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky; revidována část o přípravě alikvotu; přidáno použití odběrového média SurePath; revidována část o klinické účinnosti. Přidány nadpisy pro tabulku 5 a tabulku 6.

Omezené licenční ujednání pro test QIASure Methylation Test

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponentami dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo zařazení komponent, které jsou obsaženy v této sadě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této sadě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Kromě výslovně uvedených licencí společnost QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmějí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této soupravy souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakékoliv shora zakázané činnosti anebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat základy této smlouvy o omezené licenci u kteréhokoliv soudu a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy, včetně poplatků za právní zastoupení v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou a/nebo jejími komponentami.

Pro aktualizovanou licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

Self-screen B.V. je zákonný výrobce testu QIASure Methylation Test.

Test QIASure Methylation Test je vyráběn společností Self-screen B.V. a distribuován společností QIAGEN na území Evropy.

Ochranné známky: 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); PreservCyte® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

07-2023 HB-2304-005 1132288CS © 2023 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com