

Heinäkuu 2023

QIASure™ Methylation Test -testi Käyttöohje (käsikirja)



Versio 1

Käytettäväksi Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM -laitteiden kanssa



616014

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

113228FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	4
Yhteenveto ja selitykset.....	5
Menetelmän toimintaperiaate	5
Toimitetut materiaalit	7
Sarjan sisältö	7
Tarvitavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	7
Varoitukset ja varotoimet	10
Turvallisuustiedot	10
Yleiset varotoimet	10
AssayManager-profiiliin liittyvät varotoimet.....	12
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	13
Näytteen käsittely ja säilytys	14
PreservCyt-säilytysaineessa säilytettävien näytteiden valmistelu	16
SurePath™-säilytysaineessa säilytettävien näytteiden valmistelu.....	19
Bisulfiittikonversion yleiset suositukset	20
Protokolla: QIASure Methylation Test -testin PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella	21
Tulosten tulkitseminen	33
Vianmääritysopas.....	37
Rajoitukset	39
Suorituskykyominaisuudet	41
Havaitsemisraja (LOD)	41

Lineaarisuus	41
Tarkkuus	41
Häiritsevät aineet	42
Kliininen suorituskyky	43
Robustisuus	46
Lähdeviitteet	49
Symbolit	51
Yhteystiedot	52
Tilaustiedot	53
Asiakirjan muutoshistoria	56

Käyttötarkoitus

QIASure Methylation Test -testi (tuotenro 616014) on moninkertainen, metylaatio spesifinen real time PCR -määritys geenien *FAM19A4* ja *hsa-mir124-2* promootorien hypermetylaation tunnistamiseksi. QIASure Methylation Test -testissä voidaan käyttää bisulfiittikonvertoitua DNA:ta, joka on peräisin seuraavanlaisista näytteistä:

- *digene*® HC2 DNA Collection Device -näytteenottolaitteella otetut kohdunkaulan irtosolunäytteet (lääkärin ottamat)
- Harjatyyppisellä näytteenottimella otetut kohdunkaulan irtosolunäytteet, jotka on kerätty PreservCyt® Solution- tai SurePath™ Solution -säilytysaineeseen (lääkärin ottamat)
- Harjatyyppisellä näytteenottimella otetut emättimen irtosolunäytteet (itse otetut)

Käyttöaiheet:

1. Jatkotutkimuksena naisille, joilla ihmisen papilloomaviruksen (human papillomavirus, HPV) testitulos on positiivinen, jotta voidaan määrittää kolposkopian tai muiden jatkotoimenpiteiden tarve.
2. Jatkotutkimuksena naisille, joiden papakokeen tuloksissa on merkitykseltään epäselviä epätypillisiä levyepiteelisoluja (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), jotta voidaan määrittää kolposkopian tai muiden jatkotoimenpiteiden tarve.

Tuote on tarkoitettu teknikkojen, laboranttien ja muiden sellaisten ammattilaisten käyttöön, jotka ovat saaneet in vitro -diagnostisia (IVD) menetelmiä, molekyylibiologian tekniikoita ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -järjestelmää koskevaa koulutusta.

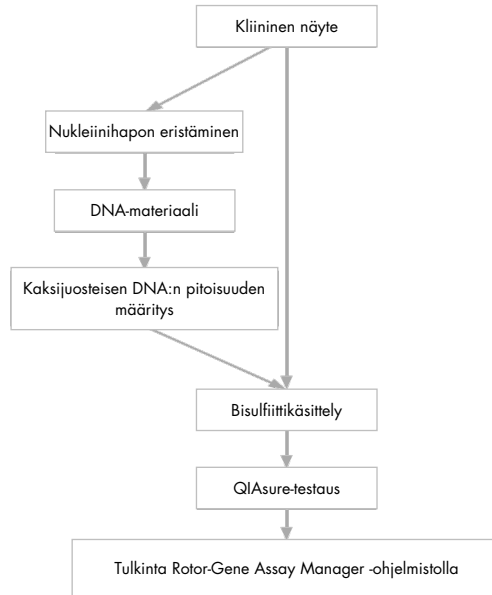
Yhteenveto ja selitykset

DNA:n metylaatio on biokemiallinen prosessi, joka on tärkeä kehittyneiden eliöiden normaalille kehitykselle (1). Metylaatioissa sytosiini-nukleotidin pyrimiidirenkaan 5. asemaan liittyy metyyliryhmä. DNA:n metylaation poikkeavuudet ovat merkittävä tekijä myös karsinogeneesissä. Useissa ihmisen syövässä ja syöpäsolulinjoissa, mukaan lukien kohdunkaulan syövässä ja kohdun limakalvon syövässä, on todettu geenien *FAM19A4* (perhe, jolla on sekvenssin samankaltaisuus 19 (kemokiinin (C-C-motiivi) kaltainen) jäsen A4) ja/tai *hsa-mir124-2* (*homo sapiens* -mikro-RNA 124-2) promootorien hypermetylaatiota (2–6). Isäntäsolun promootorien metylaatiotestillä voidaan tunnistaa syöpiä ja pitkälle edenneitä kohdunkaulan intraepiteeliaalisia neoplasioita (CIN), joilla on syövän kaltainen metylaatioprofiili ja suuri riski kehittyä syöväksi lyhyellä aikavälillä (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). QIASure-määrittelyllä voidaan todeta *FAM19A4*- ja *hsa-mir124-2*-geenien promootorien hypermetylaatio bisulfiittikonvertoidusta DNA:sta, joka on peräisin kohdunkaulan tai emättimen irtosolunäytteistä, kun näytteen sisäisenä laatukontrollina käytetään ACTB:tä (ihmisen β -aktiineeni).

Menetelmän toimintaperiaate

QIASure Methylation Test -testi on moninkertainen real-time PCR -testi, jolla monistetaan kasvunrajoitegeenien *FAM19A4* ja *hsa-mir124-2* metyloituneita promootorialueita sekä referenssigeenin metylaatioepäspesifiä fragmenttia. Sarja sisältää 2 putkea QIASure Master Mix -pääseosta ja 2 putkea QIASure Calibrator -kalibraattoria. Pääseos on tarkoitettu kliinisistä irtosolunäytteistä saadun bisulfiittikonvertoidun DNA:n monistamiseen. Pääseos sisältää alukkeet ja koettimet kohdegeeneille sekä referenssigeenille, joka toimii näytteen sisäisenä laatukontrollina. Kalibraattori on linearisoitu plasmidi, joka sisältää *FAM19A4:n*, *hsa-mir124-2:n* ja ACTB:n ampikonien sekvenssejä.

Työnkulku



QIASure-määrittäminen tehdään Rotor-Gene Q MDx -laitteella, ja Rotor-Gene AssayManager® -ohjelmisto analysoi ja tulkitsee testin tiedot automaattisesti. C_T -arvo (syklin kynnysarvo) kertoo, kuinka monta PCR-sykliä tarvitaan fluoresoivan signaalin tunnistamiseen taustasignaalista. Kynnysarvo korreloi näytteessä olevien kohdemolekyylien määrän kanssa. QIASure-määrittämisessä ΔC_T -arvo lasketaan *FAM19A4*- tai *hsa-mir124-2*-kohteiden C_T -arvon ja referenssin (ACTB) C_T -arvon erotuksena. ΔC_T on *FAM19A4*- tai *hsa-mir124-2*-geenin promootorin metylaatiotason suhteellinen kvantitatiivinen arvo. Normalisointi tehdään vähentämällä kalibraattorinäytteen ΔC_T -arvo *FAM19A4*- tai *hsa-mir124-2*-kohteiden ΔC_T -arvosta, jolloin tulokseksi saadaan $\Delta\Delta C_T$ -arvo (9). Kalibraattori on standardoitu matalan kopioluvun plasmidi-DNA-näyte, jonka kopioluku tunnetaan kaikkien kolmen kohteen osalta (*FAM19A4*, *hsa-mir124-2* ja ACTB).

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

QIASure Methylation Test -testi		72
Tuotenumero		616014
Reaktioiden määrä		72
QIASure Master Mix -pääseos (2 putkea)	Ruskean värinen putki	630 µl
QIASure Calibrator -kalibraattori (2 putkea)	Kirkkaan värinen putki	25 µl
QIASure Methylation Test -käsikirja		1

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Kemikaalien kanssa työskennellessä on aina käytettävä laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvatiedoissa (Safety Data Sheets, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

Itse otettujen näytteiden valmisteluun tarvittavat tarvikkeet ja reagenssit

- Hologic PreservCyt® Solution -liuos (Hologic)

Reagenssit SurePath-säilytysaineeseen säilytettyjen näytteiden valmisteluun

- Buffer AL (QIAGEN-tuotenumero: 19075)

Tarvikkeet ja reagenssit bisulfiittikonversioon

Verifioituja bisulfiittikonversiosarjoja ovat seuraavat:

- EZ DNA Methylation Kit -sarja (ZYMO Research, tuotenro D5001 tai D5002)
- EZ DNA Methylation-Lighting (ZYMO Research, tuotenro D5030 tai D5031)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit -sarja (QIAGEN, tuotenro 59720)
- QIASymphony Bisulfite Kit -sarja (QIAGEN, tuotenro 931106)

Rotor-Gene Q MDx -laitteen tarvikkeet

- Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (tuotenro 981103)
- Puhdistettua vettä (esim. molekyylibiologialaatu, tislattu tai deionisoitu)

Välineet

- Säädetäviä pipettejä* PCR-ajoja varten (1–10 µl; 10–100 µl)
- Kertakäyttökäsineitä
- Pöytämallinen sentrifugi*, nopeus > 10 000 rpm
- Vortex-sekoitin*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, tuotenro Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorespectrometer -fluorospektrometri (Thermo Fisher Scientific, tuotenro ND-3300) tai vastaava
- QIASymphony SP System -järjestelmä (tuotenro 9001297) valinnaiseen automaattiseen eristykseen ja/tai bisulfiittikonversioon

* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Real-time PCR -välineet

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System -järjestelmä (tuotenro 9002033) tai Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite (tuotenro 9002032)*
- Rotor-Gene AssayManager Core Application -ohjelmistoversio 1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in -lisäosa asennettuna, versio 1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 1)
- QIASure Assay Profile -määrittämisprofiili (tiedostosta AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (jossa Y on yhtä suuri tai suurempi kuin 1), jota käytetään lääkäriin otamista kohdunkaulan irtosolunäytteistä saatua bisulfiittikonvertoitua DNA:han
- Itse otettujen emättimen harjanäytteiden QIASure-määrittämisprofiili (tiedostosta AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (jossa Y on yhtä suuri tai suurempi kuin 0), jota käytetään itse otetuista emättimen harjanäytteistä saatua bisulfiittikonvertoitua DNA:han

* Rotor-Gene Q 5plex HRM -laite, joka on valmistettu tammikuussa 2010 tai myöhemmin. Valmistuspäivämäärä käy ilmi laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Varoitukset ja varotoimet

Vain in vitro -diagnostiikkaan.

Turvallisuustiedot

Kemikaalien kanssa työskennellessä on aina käytettävä laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista (Safety Data Sheet, SDS). Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety , jossa voi tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustietoja.

QIASURE MASTER MIX -PÄÄSEOS



Sisältö: 1,2,4-triatsoli: Vaara! Epäillään heikentävän hedelmällisyyttä tai vaurioittavan sikiötä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

Yleiset varotoimet

PCR-testien käyttäminen edellyttää hyvien laboratoriotäytäntöjen noudattamista, joihin kuuluu molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden huolto sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Noudata aina seuraavia ohjeita:

- Käytä kertakäyttöisiä puuterittomia suojakäsineitä, laboratoriotakkia ja suojalaseja käsitellessäsi näytteitä.

- Estä näytteen ja tarvikesarjan mikrobi- ja nukleasi (DNAasi) -kontaminaatio. DNAasi saattaa hajottaa DNA-mallin.
- Vältä DNA:n tai PCR-tuotteen siirtymiskontaminaatiota, joka voi aiheuttaa väärää positiivista signaalia.
- Käytä aina kertakäyttöpipettikärkiä, joissa ei ole DNAasia ja joissa on aerosolieste.
- QIASure-määrittelyn reagenssien laimennos on optimaalinen. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen.
- Kaikki QIASure -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä korvaa mitään reagenssia toisen QIASure-sarjan samalla reagenssilla (ei edes samasta erästä), sillä se voi vaikuttaa suorituskyyyn.
- Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöoppaassa on lisätietoja varoituksista, varotoimista ja menettelytavoista.
- Tee ennen päivän ensimmäistä ajoa Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajo (95 °C 10 minuutin ajan).
- Inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
- Älä käytä sellaisen tarvikesarjan komponentteja, jonka viimeinen käyttöpäivä on umpeutunut tai jota on säilytetty väärin.
- Vältä komponenttien altistumista valolle, koska reaktioseoksissa saattaa tällöin tapahtua muutoksia.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta seokset eivät sekoittuisi PCR-reagensseissa olevien synteettisten materiaalien kanssa.
- Hävitä näyte ja määritysäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

AssayManager-profiiliin liittyvät varotoimet

Eri näytetyypeille tarvitaan eri AssayManager-profiilit. Varmista, että käytettävä profiili vastaa testattavan näytteen tyyppiä seuraavasti:

- Kohdunkaulan raaputusnäytteiden QIASure-määrittysprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) on käytettävä lääkärin ottamista kohdunkaulan irtosolunäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han
- Itse otettujen harjanäytteiden QIASure-määrittysprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) on käytettävä itse otetuista emättimen harjanäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kuljetusolosuhteet

QIASure Methylation Test -testi toimitetaan kuivajäädssä. Jos jokin QIASure Methylation Test -testin komponentti ei ole vastaanottohetkellä jäädssä, jos ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai jos toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen tukipalveluun tai paikalliseen jälleenmyyjään (katso lisätietoja takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytysolosuhteet

QIASure Methylation Test -testi on varastoitava heti vastaanottamisen jälkeen $-30\ldots-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa olevaan pakastimeen, jonka lämpötila pysyy vakaana, ja pidettävä valolta suojattuna.

Stabiilius

Oikein säilytetty QIASure Methylation Test -testi on stabiili pakkauksen etiketissä ilmoitettuun vanhenemispäivään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan $-30\ldots-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. Toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastus- ja sulatusjaksoja saa olla enintään kolme.

- Sekoita kääntämällä putkea ylösalaisin 10 kertaa ja käytä kaikkia putkia sentrifugissa ennen avaamista.
- Reagenssien vanhenemispäivät on ilmoitettu kunkin komponentin etiketissä. Oikein säilytetyn tuotteen suoritusaste säilyy koko stabiiliuusajan, kunhan käytetään samoja komponenttieroia.

Näytteen käsittely ja säilytys

HUOMIO



Kaikkia näytteitä on käsiteltävä tartuntavaarallisenä materiaalina.

Kohdunkaulan irtosolunäytteet

QIASure-sarja on tarkoitettu kohdunkaulan irtosolunäytteistä saadun bisulfiittikonvertoidun genomisen DNA:n analyysiin. Validoidut säilytysaineet kohdunkaulan irtosolunäytteille (raaputusnäytteet) ovat PreservCyt® -säilytysaine, SurePath™-säilytysaine ja *Digene* Specimen Transport Medium (STM) -kuljetusaine. Kliinisten näytteiden säilytyslämpötilan tulisi olla 2–8 °C laboratorioon saapuessa. Näissä säilytysolosuhteissa näytteet pysyvät stabiileina PreservCyt- tai SurePath™-säilytysaineessa 3 kuukautta ennen DNA:n eristämistä.

Huomautus: Kuljetusaineeseen säilötyt kohdunkaulan irtosolunäytteet voidaan pitää testauslaboratorioon kuljetuksen aikana 2–30 °C:n lämpötilassa yön yli ja pakastaa uudestaan –20 °C:n lämpötilassa vastaanotettaessa.

Itse otetut emättimen harjanäytteet

QIASure Methylation Test -testi on tarkoitettu itse otetuista emättimen harjanäytteistä saadun bisulfiittikonvertoidun genomisen DNA:n analyysiin. Itse otetut emättimen harjanäytteet voidaan kerätä ja lähettää kuivina ja säilyttää laboratorioon saapuessaan PreservCyt-säilytysaineessa suositellussa 2–3 ml:n säilytystilavuudessa. PreservCyt-säilytysaineessa olevat näytteet säilyvät 2–8 °C:ssa tai huoneenlämmössä enintään 3 kuukautta.

Genomiset DNA-näytteet

Kun genominen DNA on eristetty, DNA-näytteitä voidaan säilyttää ja kuljettaa $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$... $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 12 kuukauden ajan.

PreservCyt-säilytysaineessa säilytettävien näytteiden valmistelu

QIASure Methylation Test -testi on validoitu kohdunkaulan irtosolunäytteistä peräisin olevan bisulfiittikonvertoidun genomisen DNA:n analyysiin. Genomisen DNA:n bisulfiittikonversio voidaan tehdä:

- i) näytteen aiemman DNA-eristyksen ja DNA:n laatukontrollin kanssa tai
- ii) suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteistä käyttämällä EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit -sarjaa (QIAGEN, tuotenro 59720) tai
- iii) suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä käyttämällä QIASymphony Bisulfite Kit -sarjaa (QIAGEN-tuotenro 931106).

Suosittellemme seuraavaa menettelyä.

- i) Näytteestä aiemmin eristetyyn DNA:n bisulfiittikonversio ja DNA:n laatukontrolli
Tässä protokollassa on ennen bisulfiittikonversioprotokollan aloittamista tehtävä DNA:n eristäminen, DNA-pitoisuuden mittaaminen ja optimaalisen eluaattimäärän jakaminen alikvootteihin. Protokolla on verifioitu käytettäväksi ZYMO Research -yhtiön EZ DNA Methylation™ Kit -sarjan (tuotenro D5001) ja EZ DNA Methylation-Lightning Kit -sarjan (tuotenro D5030) kanssa. Suosittelemme seuraavia menettelyjä:
 - DNA:n eristäminen
Vakiotyypiset DNA:n eristyssarjat (esim. kolonnityypiset ja magneettihelmiin perustuvat sarjat) ovat yhteensopivia QIASure Methylation Test -testin kanssa.
 - DNA-pitoisuuden mittaaminen
Mittaa DNA-pitoisuus ennen DNA:n bisulfiittikonvertointia. Sopivia järjestelmiä DNA-pitoisuuden mittaamiseen ovat Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (molemmat Thermo Fisher Scientific -yhtiön valmistamia) tai vastaavat.

- DNA-eluaatin jakaminen alikvootteihin
Bisulfiittikonversio toimii parhaiten, kun DNA-syötteen määrä on 100 ng – 2 µg. Suositeltava määrä bisulfiittikonversioon on 200 ng. Jos DNA-pitoisuus on liian alhainen bisulfiittikonversioon, toista DNA:n eristäminen käyttäen suurempaa kliinisen näytteen syöttötilavuutta tai eluoi DNA pienempään eluutiotilavuuteen.
- Bisulfiittikonversio EZ DNA Methylation Kit- ja EZ DNA Methylation-Lightning Kit -sarjalla tehdään valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Huomautus: EZ DNA Methylation Kit -sarjan ohjeiden mukaan näytteen DNA:n enimmäismäärä saa olla enintään 2 µg, jotta konversiotehokkuus olisi riittävän suuri (> 98 %).

- ii) Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit -sarjalla

PreservCyt® Solution -säilytysaineeseen kerätylle kohdunkaulan irtosolunäytteelle suoraan tehty bisulfiittikonversio on verifioitu QIAGENin EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit -sarjalle. Suuren pitoisuuden DNA-näytteiden (1 ng – 2 µg) ohjeet perustuvat valmistajan julkaisussa *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion Handbook* antamiin suosituksiin seuraavia kohtia lukuun ottamatta:

- Protokollan vaihe 1. Ota 2,5 % kohdunkaulan irtosolunäytettä PreservCyt® -säilytysaineesta (esim. 500 µl 20 ml:n näytemäärästä) ja erota solupelletti sentrifugoimalla 10 minuuttia vähintään nopeudella 3390 x g. Poista supernatantti ja jätä solupelletti enintään 20 µl:aan PreservCyt-säilytysainetta. Käytä bisulfiittikonversioon tätä solupellettinäytettä ja jatka valmistajan protokollan vaiheesta 2.
- Buffer BL -puskuri: Älä lisää kantaja-RNA:ta.
- Bisulfiittikonversion DNA:n eluutiomäärä on 50 µl Buffer EB -puskuriä kullekin näytteelle.
- iii) Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä QIASymphony Bisulfite Kit -sarjalla

PreservCyt® Solution -säilytysaineeseen kerätylle kohdunkaulan irtosolunäytteelle suoraan tehty bisulfiittikonversio on verifioitu QIAGENin QIAsymphony Bisulfite kit -sarjalle. Tämä perustuu QIAsymphony Bisulfite kit -sarjan käsikirjaan, ja testaus tehdään valmistajan suositusten mukaisesti.

- Ota 2,5 % kohdunkaulan irtosolunäytettä PreservCyt®-säilytysaineesta (esim. 500 µl 20 ml:n näytemäärästä) ja erota solupelletti sentrifugoimalla 10 minuuttia vähintään nopeudella 3390 x g. Poista supernatantti ja jätä solupelletti enintään 20 µl:aan jäljelle jäänyttä PreservCyt-säilytysainetta.
- Noudata bisulfiittikonversioreaktiossa "QIAsymphony SP protocol sheet – Bisulfite 140_HC_V" -ohjetta alkaen vaiheesta 2, ja käytä DNA:n sijasta solupellettiä.
- Kun bisulfiittikonversioreaktio on valmis, käynnistä SP-ajo QIAsymphony-laitteella QIAsymphony Bisulfite Kit handbook -käsikirjan "Metyloimattomien sytosiinien bisulfiittikonversio eri näytetyypeissä" -protokollassa kuvattujen vaiheiden mukaisesti. Eluutio tehdään 40 µl:ssa.

SurePath™-säilytysaineessa säilytettävien näytteiden valmistelu

SurePath-säilytysaineessa säilytetyt näytteet pitää esikäsitellä ennen DNA-eristystä. QIASure Methylation Test -testi on validoitu kohdunkaulan irtosolunäytteistä peräisin olevan bisulfiittikonvertoidun genomisen DNA:n analyysiin alla kuvatun toimenpiteen mukaisesti.

- Ota 2,5 % kohdunkaulan irtosolunäytteestä
- Sentrifugoi 10 minuuttia 4000 g:ssä, poista supernatantti mutta jätä 100 µl SurePath™ -säilytysnestettä
- Lisää 100 µl buffer AL -puskuria ja suspendoi pelletti uudelleen
- Sekoita hyvin ja inkuboi 20 minuuttia 90 °C:ssa
- Jäähdytä 5 minuuttia huoneenlämmössä.
- Eristä DNA QIAamp DNA mini kit -sarjan avulla (tai vastaavalla) valmistajan ohjeen mukaisesti, eluoi DNA 50 µl:ssa.
- Mittaa DNA, sopivia järjestelmiä ovat Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorometer (molemmat Thermo Fisher Scientific -yhtiön valmistamia) tai vastaavat.
- 200 ng DNA:ta suositellaan bisulfiittikonversioon, ja jos 200 ng:tä ei ole saatavilla, käytä suurinta syötettävää määrää. Tee konversio EZ DNA methylation kit- tai EZ DNA Methylation-Lightning -sarjalla (Zymo) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Käytä 2,5 µl eluaattia QIASure Methylation Test -testiin.

Bisulfiittikonversion yleiset suositukset

Bisulfiittikonversioreaktiota ei saa suorittaa alueella, jossa QIASure Master Mix -pääseosta säilytetään ja annostellaan, jotta vältetään reagenssien kontaminaatio.

QIASure-reaktiossa bisulfiittikonvertoidun DNA-syötteen määrä on 2,5 µl.

Jos näytteen sisäinen laatukontrolli on negatiivinen (eli ACTB:n C_T -arvot ovat $> 26,4$), näytteen DNA:n bisulfiittikonversion tuloksena saadun materiaalin laatu ja/tai määrä ei ole riittävä, ja järjestelmä määrittää näytteen virheelliseksi. Tee suositellut toimet, jotta saat hyväksyttävällä vaihteluvälillä olevan ACTB:n C_T -arvon:

- Näytteestä aiemmin eristetyn DNA:n bisulfiittikonversio ja DNA:n määräkontrolli: Toista bisulfiittikonversioreaktio käyttäen suurempaa DNA:n syötettä ja/tai toista DNA:n eristäminen käyttäen suurempaa kohdunkaulan irtosolunäytteen syötettä
- Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä: Toista bisulfiittikonversioreaktio käyttäen 10 % * PreservCyt-säilytysaineeseen kerätystä kohdunkaulan irtosolunäytteestä (esim. 2 ml 20 ml:n näytteestä).

Bisulfiittikonvertoitua DNA:ta voidaan säilyttää enintään 24 tunnin ajan 2–8 °C:ssa, enintään 5 päivän ajan –25...–15 °C:ssa ja enintään 3 kuukautta alle –70 °C:ssa. Bisulfiittikonvertoidun DNA:n toistuvaa pakastamista ja sulatusta on aina vältettävä. Näytteen laadun säilyttämiseksi pakastus- ja sulatusjaksoja saa olla enintään kolme.

* Suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä tehdystä bisulfiittikonversiossa voidaan käyttää suurempaa syötettä, jos onnistumisprosentti jää liian pieneksi näytteenoton vaihtelun vuoksi (joka voi johtua esim. riittämättömästä näytteenotosta).

Protokolla: QIASure Methylation Test -testin PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella*

Tärkeitä huomioita ennen aloittamista

- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Katso laitteen (tuotenro 9002033 tai 9002032) käyttöopas.
- Tee ennen päivän ensimmäistä ajoa Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajo (95 °C 10 minuutin ajan).
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmisto tulkitsee PCR-tulokset automaattisesti. QIASure-sarja on ajettava Rotor-Gene Q MDx -laitteella käyttäen Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistoa. Tutustu Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistoon (tuotenro 9022739) ja Epsilon Plug-In -lisäosaan ja lue molemmat käyttöoppaat.
- Eri näytetyypeille tarvitaan eri Rotor-Gene AssayManager v1.0 Assay Profiles -määrittäprofiilit. Varmista, että käytettävä profiili vastaa testattavan näytteen tyyppiä seuraavasti:
 - Kohdunkaulan raaputusnäytteiden QIASure-määrittäprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) on käytettävä lääkärin ottamista kohdunkaulan irtosolunäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han
 - Itse otettujen harjanäytteiden QIASure-määrittäprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) on käytettävä itse otetuista emättimen harjanäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han

Huomautus: Testillä voi testata vain yhden näytetypin kerrallaan. Eri määrittäprofiilit on optimoitu kullekin näytetyypille, joten on erittäin tärkeää valita oikea määrittäprofiili, jotta kunkin näytetypin tulokset olisivat optimaaliset.

* Rotor-Gene Q 5plex HRM -laite, joka on valmistettu tammikuussa 2010 tai myöhemmin. Valmistuspäivämäärä käy ilmi laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Ennen kuin aloitat

- Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitettyssä tietokoneessa on oltava asennettuna Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoversio v1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 4). Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application -ohjelmistosta on *Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application* -käyttöoppaassa.
 - QIASure Methylation Test -testiin tarvitaan erillinen Epsilon Plug-in -lisäosa (versio 1.0.1 tai uudempi). Tämän lisäosan voi ladata QIAGENin verkkosivulta osoitteesta <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Tämä lisäosa on asennettava tietokoneeseen, jossa on asennettuna Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston versio 1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 4).
 - QIASure Methylation Test -testiin tarvitaan määrityskohtainen profiili, jota käytetään Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmiston kanssa. Määritysprofiili sisältää kaikki testin sykleihin ja analyysiin tarvittavat parametrit. QIASure Assay Profiles -määritysprofiileja on kaksi:
 - Kohdunkaulan raaputusnäytteiden QIASure-määritysprofiilia (tiedostossa AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) käytetään lääkärin ottamiin kohdunkaulan irtosolunäytteisiin
 - Itse otettujen harjanäytteiden QIASure-määritysprofiilia (tiedostossa AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) käytetään itse otettuihin emättimen harjanäytteisiin. Profiilit voidaan ladata QIASure Methylation Test -testin verkkosivulta osoitteesta <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Määritysprofiili on tuotava Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoon.
- Huomautus: QIASure -sarja voidaan ajaa vain, jos Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistossa on määritetty tietyt asetukset.

Järjestelmänlaajuisen prosessin turvallisuuden varmistamiseksi seuraavat pakolliset asetukset on määritettävä suljetulle tilalle:

- "Material number required" (Materiaalinumero pakollinen)
- "Valid expiry date required" (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen)
- "Lot number required" (Eränumero pakollinen)

Epsilon Plug-in -lisäosan asennus ja määritysprofiilin tuominen

Epsilon Plug-in -lisäosan ja määritysprofiilin asennus ja tuonti on selostettu *Rotor-Gene AssayManager Core Application User-* ja *Epsilon Plug-in User* -käyttöoppaissa.

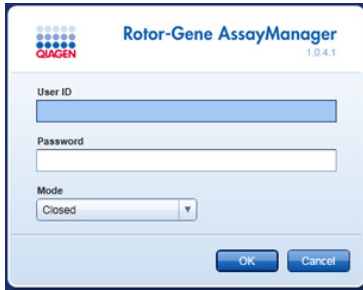
- Lataa sekä Epsilon Plug-in -lisäosa että QIASure Assay Profile -määritysprofiilin viimeisin versio QIAGENin verkkosivuilta.
- Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla EpsilonPlugin.Installation.msi-tiedostoa. Noudata näyttöön tulevia asennusohjeita. Tarkempia tietoja on *Rotor-Gene AssayManager Core Application* -käyttöoppaan kohdassa "Installing Plug-ins" (Lisäosien asentaminen).

Huomautus: Koko järjestelmän prosessiturvallisuuden vuoksi määritä suljettu toimintatila valitsemalla Settings (Asetukset) -välilehden osiosta Work list (Työluettelo) valintaruudut Material number required (Materiaalinumero pakollinen), Valid expiry date required (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen) ja Lot number required (Eränumero pakollinen). Jos valintaruutuja ei ole jo valittu, valitse ne napsauttamalla.

- Kun lisäosa on asennettu onnistuneesti, Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston pääkäyttäjän on tuotava AP_QIASure_V1_O_Y.iap-määritysprofiili seuraavasti.

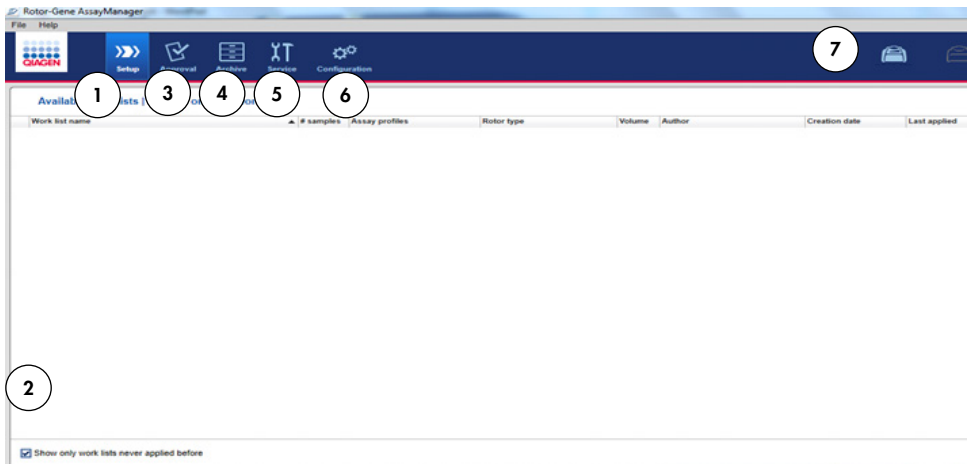


1. Avaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto napsauttamalla kuvaketta. The Rotor-Gene AssayManager -ikkuna avautuu (kuva 1).



Kuva 1. Rotor-Gene AssayManager -kirjautumisikkuna.

2. Kirjaudu sisään Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoon käyttäjätunnuksellasi ja salasananallasi. Älä muuta "Closed" (Suljettu) -toimintatilan asetusta. Valitse OK. Näkyviin tulee Rotor-Gene Assay Manager -näyttö (katso seuraavaa kuvaa).



- 1 Set-up (Asetukset) -välilehti. Tässä välilehdessä voit hallita ja käyttää työluetteloita.
- 2 Jos valitset "Show only work lists never applied before" (Näytä vain uudet työluettelot), näkyviin tulevat vain uudet työluettelot.
- 3 Approval (Hyväksyntä) -välilehti. Voit hakea aiempia testejä (ajoja).
- 4 Archive (Arkisto) -välilehti. Voit hakea aiempia jo hyväksytyjä testejä (ajoja).

- 5 Service (Huolto) -välilehti. Voit tarkastella kaikkien ohjelmiston luomien tiedostojen auditointilokeja
- 6 Configuration (Konfigurointi) -välilehti. Voit määrittää kaikkien ohjelmistoparametrien asetukset
- 7 Rotor-Gene Q MDx -kuvakkeet.



Ei yhteyttä

Yhteys muodostettu

3. Valitse Configuration (Konfigurointi) -välilehti.
 4. Valitse Assay Profiles (Määritysprofiilit) -välilehti.
 5. Valitse Import (Tuo).
 6. Valitse valintaikkunassa määritysprofiili, jonka haluat tuoda (Assay Profile AP_QIAzure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap kohdunkaulan irtosolunäytteille ja/tai Assay Profile AP_QIAzure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) ja valitse Open (Ava).
 7. Kun määritysprofiili on tuotu, se voidaan ottaa käyttöön "Setup" (Asetukset) -välilehdessä.
- Huomautus: Määritysprofiilin samaa versiota ei voi tuoda kahdesti.

Näytteiden käsittely Rotor-Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Yhdessä ajossa (testissä) voidaan testata enintään 70 bisulfiittikonvertoitua DNA-näytettä kalibraattorinäytteen ja mallittoman kontrollin lisäksi. Taulukossa 1 on esimerkki latauslohkon tai roottorin asettelusta QIASure Methylation Test -testiä tehtäessä. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Taulukko 1. Levyn ja roottorin asettelu QIASure-sarjan ajossa Rotor-Gene Q MDx-laitteella

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

HUOMIO



Putket on asetettava roottoriin taulukossa 1 kuvatulla tavalla. Määritysprofiilissa määritetty automaattinen analyysi perustuu tähän järjestykseen. Jos järjestys on erilainen, tuloksista tulee poikkeavia.

Huomautus: Täytä kaikki käyttämättömät paikat tyhjiillä putkilla.

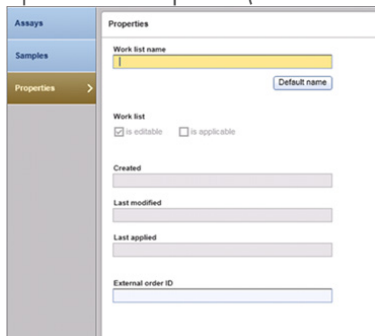
PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Tee ennen päivän ensimmäistä ajoa Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajo (95 °C 10 minuutin ajan).

1. Luo käsiteltävästä näytteestä työluettelo seuraavasti:

- 1a. Käynnistä Rotor-Gene Q MDx -laite.
- 1b. Avaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto ja kirjaudu käyttäjän roolissa suljetussa toimintatilassa.
- 1c. Valitse "Setup" (Asetukset) -välilehti ja työluetteloiden hallinnassa New work list (Uusi työluettelo).
- 1d. Valitse käytettävissä olevien määrittäprofiilien luettelosta QIASure Assay Profile (QIASure-määrittäprofiili).
Huomautus: AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap-määrittäprofiilia on käytettävä kohdunkaulan irtosolunäytteille ja AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap-määrittäprofiilia itse otetuille emättimen harjanäytteille.
Huomautus: Testillä voi testata vain yhden näytetyyppin kerrallaan.
- 1e. Valitse Move (Siirrä). Valittu määrittäprofiili siirtyy Selected assay profiles (Valitut määrittäprofiilit) -luetteloon. Määrittäprofiilin pitäisi nyt näkyä "Selected assay profiles" (Valitut määrittäprofiilit) -luettelossa.
- 1f. Kirjoita näytteiden lukumäärä vastaavaan kenttään.
- 1g. Kirjaa seuraavat QIASure-sarjan tiedot, jotka on painettu laatikon kanteen.
 - Materiaalinumero: 1102417
 - Viimeinen käyttöpäivä muodossa VVVV-KK-PP
 - Eränumero
- 1h. Valitse Samples (Näytteet) -vaihe. AssayManager-näyttöön tulee näkyviin luettelo näytteiden tiedoista. Luettelo kuvaa roottorin oletettua asetelua.
- 1i. Kirjoita luetteloon näytteen tunnistenumero(t) ja mahdolliset muut valinnaiset näytetiedot kommenttina jokaisen näytteen kohdalle.

1j. Valitse Properties (Ominaisuudet) -vaihe ja kirjoita työluettelon nimi (kuva 2).



Kuva 2. Ominaisuudet

1k. Valitse is applicable (on käytettävissä) -valintaruutu ja valitse sitten Apply (Käytä).

1l. Tallenna työluettelo.

Työluettelon voi tulostaa helpottamaan PCR:n valmistelua ja asetusten määrittämistä. Jos haluat tulostaa työluettelon, valitse Print work list (Tulosta työluettelo). Työluettelossa näkyvät myös näytteen tiedot.

Huomautus: Työluettelon voi luoda sen jälkeen, kun ajo on määritetty laitteeseen, ja tallentaa ennen näytteiden lisäämistä laitteeseen.

2. Määritä QIAure-ajo.

PCR-reaktion kontaminaatoriskin vähentämiseksi on suositeltavaa käyttää PCR-kaappia, jossa on UV-säteilytysmahdollisuus.

QIAure Master Mix -pääseoksen annostelua ei saa tehdä alueella, jossa DNA:n bisulfiittikonversioreaktio tapahtuu.

Puhdista työalusta, pipetit ja putkiteline ennen DNA:ta hajottavan liuoksen käyttöä, jotta malli- tai nukleasikontaminaation riski pienenee.

Huomautus: Vaihda pipetin kärki jokaisen putken kohdalla. Näin vältät väärät positiiviset tulokset, jotka ovat seurausta ei-spesifin mallin tai reaktioseoksen aiheuttamasta kontaminaatiosta.

2a. Sulata QIAure Master Mix -pääseos ja QIAure Calibrator -kalibraattori kokonaan ja suojaa QIAure Master Mix -pääseos valolta aina kun mahdollista.

Huomautus: Sulatusvaihe saa kestää enintään 30 minuuttia, jotta materiaali ei hajoa.

2b. Sekoita putkia varovasti kääntämällä ne ylösalaisin 10 kertaa ja käytä niitä sentrifugissa hetken aikaa ennen käyttöä.

2c. Annostele 17,5 µl käyttövalmista QIAure Master Mix -pääseosta kyseisiin liuskaputkiin. Reaktio voidaan valmistella huoneenlämmössä.

2d. Vie QIAure Master Mix -pääseos takaisin pakastimeen, jotta materiaali ei hajoa.

2e. Kuljeta putket eri alueelle määrityksen kontrollien ja bisulfiittikonvertoitujen näytteiden annostelua varten.

2f. Lisää 2,5 µl vettä paikkaan 2, (NTC) (no template control, malliton kontrolli) (katso taulukko 1 yllä). Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

2g. Lisää 2,5 µl QIAure Calibrator -kalibraattoria paikkaan 1 (katso taulukko 1 yllä). Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas. Sulje putki korkilla.

2h. Lisää vastaavaan putkeen 2,5 µl bisulfiittikonvertoitua DNA:ta. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

2i. Kun olet täyttänyt 4 putken ryhmän, sulje putket korkilla.

Huomautus: PCR-putkia voidaan säilyttää pimeässä, 2–8 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia näytteiden pipetoinnin ja kokeen käynnistämisen välillä.

2j. Vie QIAure Calibrator -kalibraattori takaisin pakastimeen, jotta materiaali ei hajoa.

Huomautus: Vaihda pipetin kärki jokaisen putken kohdalla. Näin vältät väärät positiiviset tulokset, jotka ovat seurausta ei-spesifin mallin tai reaktioseoksen aiheuttamasta kontaminaatiosta.

3. Valmistele Rotor-Gene Q MDx -laite ja aloita ajo (testi) seuraavasti:

3a. Aseta 72-kuoppainen roottori roottoripidikkeeseen.

3b. Aseta liuskaputket paikoilleen roottoriin: aloita paikasta 1 taulukon (taulukossa 1) esittämällä tavalla. Aseta kaikkiin käyttämättömiin paikkoihin tyhjä, korkilla suljettu putki.

Huomautus: Varmista, että ensimmäinen putki on asetettu paikkaan 1 ja että liuskaputket on asetettu oikeisiin suuntiin ja paikkoihin taulukossa 1 esitetyllä tavalla.

3c. Kiinnitä lukitusrengas.

- 3d. Lataa roottori ja lukitusrengas Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ja sulje laitteen kansi.
- 3e. Valitse Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistossa joko vastaava työluettelo työluetteloiden hallinnasta ja valitse Apply (Käytä). Jos työluettelo on vielä auki, valitse Apply (Käytä).

Huomautus: Jos ajon työluetteloa ei ole luotu, kirjaudu Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistoon ja tee kohdassa 1 kuvatut toimet ennen kuin jatkat ajon valmistelua.

- 3f. Kirjoita ajon (testin) nimi.
 - 3g. Valitse käytettävä sykleri Cyclor selection (Syklerin valinta) -luettelossa.
 - 3h. Tarkista, että lukitusrengas on kiinnitetty oikein ja vahvista näytössä, että lukitusrengas on kiinnitetty.
 - 3i. Valitse Start experiment (Aloita testi).
- QIASure Methylation Test -testin ajo alkaa.

4. Kun ajo on päättynyt, valitse Finish run (Lopeta ajo).

5. Vapauta ja hyväksy ajo.

- Jos olet kirjautunut sisään Approver (Hyväksyjä) -roolissa, valitse Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään).
- Jos olet kirjautunut sisään Operator (Käyttäjä) -roolissa, valitse Release (Vapauta).

6. Vapauta tulokset.

- Jos valitsit Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään), testin tulokset tulevat näkyviin.
- Jos Release (Vapauta) -vaihtoehdon valitsi käyttäjän roolissa kirjautunut käyttäjä, jonkun toisen käyttäjän on kirjauduttava sisään "Approver" (Hyväksyjä) -roolissa ja valittava "Approval" (Hyväksyntä) -välilehti.
- Hae suodatinvaihtoehtojen avulla näkyviin määritys, jonka haluat hyväksyä, ja valitse sitten Apply (Käytä).
- Tarkista ja hyväksy kunkin testinäytteen tulokset.

Siirry "Results" (Tulokset) -taulukossa sen näytteen kohdalle, jonka haluat hyväksyä.

Jokaisen hyväksyntää odottavan tulosrivin lopussa on kolme näppäintä.

Valitse näytteen tuloksen kohdalla joko accept (hyväksy) tai reject (hylkää).

Huomautus: Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston automaattisesti INVALID (VIRHEELLINEN) -tilaan asettamaa tulosta ei voi enää muuttaa kelvolliseksi, vaikka hylkäisit tuloksen.

Valinnainen: Voit kirjoittaa näytettä koskevan kommentin Sample comment (Kommentti näytteestä) -sarakeeseen.

- Valitse Release/Report data (Vapauta/raportoi tiedot).
- Valitse OK. Järjestelmä luo PDF-muotoisen raportin ja tallentaa sen automaattisesti ennalta määritettyyn kansioon. Kansiopolku on oletusarvoisesti: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Huomautus: Tätä polkua ja kansiota voi muuttaa Configuration (Konfigurointi) -ympäristössä.

- Siirry Archive (Arkisto) -välilehteen viemään raakadatan sisältävä .rex-tiedosto. Valitse haluamasi suodatusvaihtoehdot ja valitse show assays (näytä määritykset). Valitse sitten Export .rex file (Vie .rex-tiedosto) ja OK. Ohjelmisto tallentaa .rex-tiedoston automaattisesti seuraavaan ennalta määritettyyn kansioon: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**

Huomautus: Tämän polun ja kansion voi muuttaa välilehdessä Specify the .rex file export destination (Määritä .rex-tiedoston vientikansio).

Huomautus: Vianmäärittystä varten tarvitaan ajosta luotu tukipaketti. Tukipaketin voi luoda Approval (Hyväksyntä)- tai Archive (Arkisto) -välilehdessä. Katso lisätietoja *Rotor-Gene AssayManager Core Application* -käyttöoppaan luvun Troubleshooting (Vianmäärittys) kohdasta "Creating a support package" (Tukipaketin luominen). Käyttöopas on osoitteessa <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Lisäksi auditointilokista (tapahtumahetki $\pm$ 1 päivä) voi olla hyötyä. Auditointilokin voi hakea Service (Huolto) -välilehdestä (*Rotor-Gene AssayManager Core Application* -käyttöopas).

7. Poista Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ladatut materiaalit ja hävitä liuskaputket paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

Tulosten tulkitseminen

Analyysi tapahtuu täysin automaattisesti.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysoi ensin monistuskäyriä ja voi määrittää epäyhteensopivat käyrät virheellisiksi niiden muodon ja kohina-amplitudin mukaan. Tällaiset käyrät on merkitty erityisellä merkinnällä (katso taulukko 2).

Sen jälkeen Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysoi ajon kontrollit.

- Kalibraattori
- NTC (Malliton kontrolli)

Huomautus: Ajon päätteeksi luodussa raportissa näkyvät ajon kontrolleista saadut tulokset. Ohjelman virheellisiksi määrittämien tietojen kohdalla on erityinen merkintä.

Jos kaikki ajon kontrollit ovat määritysten mukaisia, Rotor-Gene AssayManager analysoi tuntemattomat näytteet.

Taulukko 2 esittelee virheellisen näytteen merkinnät, jotka voidaan määrittää yksittäiselle putkelle Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmiston analyysissä, sekä selitykset tämän merkinnän tarkoituksesta.

Taulukko 2. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset

Merkintä	Järjestelmän tekemä määritys	Kuvaus
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Hylätty)	Kohdearvo on suurempi kuin määritetyn arvoalueen yläraja. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo, esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo.
ASSAY_INVALID (MÄÄRITYS_VIRHEELLINEN)	Invalid (Hylätty)	Määrittys on virheellinen, sillä vähintään yksi ulkoinen kontrolli on virheellinen.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Hylätty)	Kohdearvo on pienempi kuin määritetyn arvoalueen alaraja. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo, esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo.
CONSECUTIVE_FAULT (PERÄKKÄINEN_VIKA)	Invalid (Hylätty)	Kohteen laskennassa käytetty kohde on virheellinen.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (KÄYRÄN_MUODON_POIKKEAMA)	Invalid (Hylätty)	Raakadatan monistuskäyrän muoto on tälle määrittämiselle epätyypillinen. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulokinnan todennäköisyys on suuri.
FLAT_BUMP (LITTEÄ_TÖYSSY)	Invalid (Hylätty)	Raakadatan monistuskäyrän muoto on tälle määrittämiselle epätyypillinen (laakea kohouma). Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulokinnan todennäköisyys on suuri (esimerkiksi virheellinen CT -arvon määrittäminen).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Kelvollinen)	NTC-kontrollin signaalin C_T -arvot kohde- $ACTB$:lle ovat suurempia kuin 36.
INVALID_CALCULATION (VIRHEELLINEN_LASKENTA)	Invalid (Hylätty)	Kohteen laskenta epäonnistui.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (USEAN_KYNNYKSEN_YLITYS)	Invalid (Hylätty)	Monistuskäyrä ylittää kynnyksarvon useammin kuin kerran. Yksiselitteistä C_T -arvoa ei voida määrittää.
NO_BASELINE (EI_LÄHTÖTASOA)	Invalid (Hylätty)	Ensimmäisen perustason alkuarvoa ei löydy.
NO_CT_DETECTED	Muuttuja	Kohteelle ei havaittu C_T -arvoa.
NO_VALUE	Invalid (Hylätty)	Kohteella ei ole arvoa, vaikka sillä edellytetään olevan arvo. Arvon ei tarvitse olla tietyllä alueella. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo (esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Warning (Varoitus)	Normalisoinnin aikana ilmeni poikkeama. Monistuskäyrässä näkyy vain oletusarvo. Tulosten oikeellisuus on tarkistettava manuaalisesti.
OTHER_TARGET_INVALID (TOINEN_KOHDE_KELVOTON)	Invalid (Hylätty)	Saman näytteen toinen kohde on virheellinen.

Taulukko 2. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset

SATURATION (SATURAATIO)	Invalid (Hylätty)	Fluoresenssin raakadata saturoituu voimakkaasti ennen monistuskäyrän käänne pistettä.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warning (Varoitus)	Fluoresenssin raakadata saturoituu ennen monistuskäyrän tasannevaihetta.
SPIKE (PIIKKI)	Warning (Varoitus)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatasaa piikki, mutta se on C_T -määritysalueen ulkopuolella.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (PIIKKI_LÄHELLÄ_CT:TÄ)	Invalid (Hylätty)	Monistuskäyrässä havaittiin piikki lähellä C_T -arvoa.
STEEP_BASELINE (JYRKÄ_PERUSTASO)	Invalid (Hylätty)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatasaa jyrkästi nouseva perustaso.
STRONG_BASELINE_DIP (VOIMAKAS_PERUSTASON_PUDOTUS)	Invalid (Hylätty)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatasaa jyrkästi laskeva perustaso.
STRONG_NOISE (VOIMAKAS_KOHINA)	Invalid (Hylätty)	Monistuskäyrän kasvuvaiheen ulkopuolella havaittiin voimakasta kohinaa.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (VOIMAKAS_KOHINA_KASVUVAIHEESSA)	Invalid (Hylätty)	Monistuskäyrän kasvuvaiheessa (eksponentiaalisessa vaiheessa) havaittiin voimakasta kohinaa.
UNCERTAIN	Muuttuja	AUDAS (Automatic Data Scan) -tulokset ovat ristiriidassa ydinanalyysin tulosten kanssa. Tietojen kelvollisuuden yksiselitteinen automaattinen arviointi ei ole mahdollista.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Muuttuja	Havaittiin C_T -arvo kohteelle, jonka ei pitäisi monistua.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Hylätty)	Kohteella on arvo, mutta arvo ei ole odotettu. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo (esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo).
UPSTREAM	Muuttuja	Upstream-prosessi (esim. QIAAsymphony) asetti näytteen tilaksi Invalid (virheellinen) tai Unclear (epäselvä). Huomautus: Rotor-Gene AssayManagerin toiminta epäselväksi merkittyjen näytteiden kohdalla voidaan määrittää AssayManager-ohjelmiston "Configuration" (Konfigurointi) -välilehdessä. Upstream-prosessien "Invalid" (Virheellinen) -merkintä aiheuttaa aina sen, että vastaava näyte määritetään virheelliseksi myös Rotor-Gene AssayManagerissa.

Taulukko 2. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset

WAVY_BASE_FLUORESCENCE (AALTOILEVA_PERUSTASO_FLUORESENSSISSA)	Invalid (Hyläyty)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa aaltoileva perustaso.
--	-------------------	--

- Jos kaikki ajon kontrollit ovat kelvollisia, Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysoi tuntemattomat näytteet. Näytteessä on oltava pieni määrä bisulfiittikonvertoitua DNA:ta, jotta tulokset voidaan tulkita. Tämä käy ilmi ylläpitogeeni ACTBC:n T -arvosta. Sen on oltava $\leq 26,4$, jotta Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto voi validoida näytteen.
- Sen jälkeen ohjelmisto laskee *FAM19A4:n* ja *hsa-mir124-2:n* $\Delta\Delta C_T$ -arvot ja antaa tuloksen. Jos jokin $\Delta\Delta C_T$ -arvo on raja-arvon alapuolella, järjestelmä antaa kohteelle merkinnän "Hypermethylation positive" (Hypermetylaatioposiitiivinen).
Huomautus: Osittainen tai alhainen metylaatiotaso on luonnollinen ilmiö, jolla ei ole suoraa yhteyttä syövän kehittymiseen (toisin kuin hypermetylaatiolla).
- Näyte on "Hypermethylation positive" (Hypermetylaatioposiitiivinen), jos ainakin yksi kohde saa merkinnän "Hypermethylation positive" (Hypermetylaatioposiitiivinen).
- Järjestelmä saattaa määrittää vääriksi negatiivisiksi näytteet, joissa DNA:n laatu tai määrä on alhainen (esim. ACTB:n C_T -arvot juuri ja juuri hyväksyntärajoissa, C_T -arvot 25–26,4). Tällöin suositellaan kunkin PCR:n uusintatestausta yksittäin. Negatiivinen tulos toistetussa testissä tarkoittaa, että näyte on hypermetylaationegatiivinen. Positiivinen tulos tarkoittaa, että näyte on hypermetylaatioposiitiivinen.
- Näytteisiin, joiden solukkuus on korkea ja jotka käsitellään suoralla konversioprotokollalla, liittyy riski, että PCR-reaktio ylikuormittuu DNA:lla, mikä voi johtaa FAM19A4-kohteen virheellisesti negatiiviseen tulokseen. Siksi, jos näytteillä on 1) negatiivinen hypermetylaatiotulos, 2) ACTB C_T -arvo ≤ 23 ja 3) FAM19A4 $\Delta\Delta C_T$ -arvo väliltä 10,36–11,36, PCR on suositeltavaa toistaa 5 kertaa pienemmällä konvertoidun DNA:n määrällä laimentamalla näytettä vedellä.

Vianmääritysopas

Tämä vianmääritysopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Katso myös usein kysyttyjä kysymyksiä (Frequently Asked Questions, FAQ) teknisen tuen sivulta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat mielellään kaikkiin kysymyksiin näissä käyttöohjeissa esitetyistä tiedoista ja protokollista tai näytteiden ja määritysten käsittelyyn liittyvistä tekniikoista. (Katso yhteystiedot tämän käsikirjan takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston vianmäärityksestä on *Rotor-Gene AssayManager Core Application* -käyttöoppaassa

Huomautuksia ja ehdotuksia

Yleinen käsittely

Näytteen DNA-pitoisuus on liian alhainen bisulfiittikonversioon

Tarkista DNA:n eristykseen tulos

Toista DNA:n eristäminen konsentroituneemmalla kliinisellä näytteellä

Näyte hylätään: ACTB:n monistuminen on liian vähäistä tai sitä ei tapahdu lainkaan

a) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois

Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.

b) Tarkista DNA-konsentraatti

Lisää bisulfiittikonversion DNA-syöte enimmäismäärään. Bisulfiittikonversioreaktio toimii parhaiten, kun DNA-syöteen määrä on 100 ng – 2 µg

c) Tarkista "Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteessä" -protokollaa varten kliininen solukuusnäyte

Toista bisulfiittikonversioreaktio käyttäen 10 % PreservCyt-säilytysaineeseen kerätystä kohdunkaulan irtosolunäytteestä (esim. 2 ml 20 ml:n näytteestä).

d) Tarkista bisulfiittikonvertoitu eluaatti

Toista bisulfiittikonversio ja lisää tarvittaessa DNA-syöteen määrää.

Näyte hylätään: kohteet *FAM194A4* ja/tai *hsa-mir124-2* ovat virheellisiä

Riittämätön sekoittuminen

Sekoita näytettä ja reaktioseosta pipetoimalla (noin 10 kertaa/putki). Toista näytteen käsittely.

Positiivinen kontrolli hylätään: yhden tai useamman kohteen monistuminen on liian vähäistä tai sitä ei tapahdu lainkaan

a) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois

Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.

Huomautuksia ja ehdotuksia

b) Osittainen hajoaminen	Säilytä sarjan sisältöä -30...-15 °C:n lämpötilassa. Vältä toistuvaa jäätymistä ja sulamista. Pakastus- ja sulatusjaksoja saa olla enintään kolme.
c) PCR-reagenssien osittainen pilaantuminen	Säilytä sarjan sisältöä -30...-15 °C:n lämpötilassa ja suojaa reaktioseokset valolta. Vältä toistuvaa jäätymistä ja sulamista.
d) Liuskaputken kääntäminen	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
e) Viimeinen käyttöpäivä	Tarkista käytetyn sarjan viimeinen käyttöpäivä.
f) Viive näytteiden pipetoinnin ja ajon alkamisen välillä	Kun näytteet on annosteltu PCR-reaktioita varten, PCR-reaktioseoksia voi säilyttää pimeässä 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 30 minuutin ajan ennen ajon käynnistämistä laitteessa.

Malliton kontrolli (No template control, NTC) hylätään

a) Pipetointivirhe	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.
b) Ristikontaminaatio	Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit. Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita aina yleisesti hyväksyttyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi.
c) Reagenssin kontaminaatio	Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit. Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita aina yleisesti hyväksyttyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi.
d) Liuskaputken kääntäminen	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
e) Viive näytteiden pipetoinnin ja ajon alkamisen välillä	Kun näytteet on annosteltu PCR-reaktioita varten, PCR-reaktioseoksia voi säilyttää pimeässä 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 30 minuutin ajan ennen ajon käynnistämistä laitteessa.
f) Koettimen hajoaminen	Suojaa reaktioseokset valolta. Tarkista, näkykö fluoresenssikäyrässä virheellisesti positiivinen tulos.

Näytteen signaaleja puuttuu tai ne ovat heikkoja, mutta kontrolliajo onnistuu

a) Inhiboivat vaikutukset	Kun teet bisulfiittikonversiota, tarkista aina sentrifugoinnin jälkeen, ettei suodattimessa ole puskuriliuoksen jäämiä. Toista bisulfiittikonversio.
b) Pipetointivirhe	Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.

Jos ongelma ei poistu, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen tukipalveluun.

Rajoitukset

QIASure Methylation Test -testin reagensseja saa käyttää ainoastaan in vitro -diagnostiikassa.

PCR-testien käyttäminen edellyttää hyvien laboratoriokäytäntöjen noudattamista, joihin kuuluu molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden huolto sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämän sarjan mukana toimitetut reagenssit ja ohjeet on validoitu suorituskyvyltään optimaaliseksi.

QIASure Methylation Test -testiä saavat käyttää laboratoriotyöntekijät, jotka ovat saaneet Rotor-Gene Q MDx -laitteiden ja Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmiston käyttökoulutusta.

Tätä tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet real-time PCR-tekniikoita ja diagnostisia in vitro -menetelmiä koskevaa erityisopastusta ja -koulutusta. Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa.

Optimaalisten PCR-tulosten saamiseksi käyttöoppaan ohjeita on noudatettava tarkasti.

Kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Järjestelmä saattaa määrittää vääriksi negatiivisiksi näytteet, joissa DNA:n laatu tai määrä on alhainen (esim. ACTB:n C_T -arvot juuri ja juuri hyväksyntärajoissa, C_T -arvot 25–26,4). Tällöin suositellaan kunkin näytteen uusintatestausta yksittäin. Negatiivinen tulos toistetussa testissä tarkoittaa, että näyte on hypermetylaationegatiivinen. Positiivinen tulos tarkoittaa, että näyte on hypermetylaatioposiitivinen.

Kaikki QIASure Methylation Test -testin reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Muunlainen käyttö saattaa heikentää testin suorituskykyä.

QIASure Methylation Test -testi on validoitu HPV-positiivisille naisille.

QIASure Methylation Test -testi on validoitu kohdunkaulan irtosolunäytteille, jotka on kerätty ja säilöty PreservCyt-, SurePath™- tai STM-säilytysaineeseen, sekä itse otetuille emättimen harjanäytteille, jotka on säilöty PreservCyt-säilytysaineeseen niiden saapuessa laboratorioon.

Vain Rotor-Gene Q MDx -laite on validoitu käytettäväksi QIASure Methylation Test -testin PCR Assay -määrittelyn kanssa.

Tuotteen off label -käyttö ja/tai komponenttien muokkaaminen mitätöi Self-screen B.V -yhtiön vastuun.

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suoritustaso kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita Self-screen B.V -yhtiön suoritustasoa koskevat tutkimukset eivät kata.

Suorituskykyominaisuudet

Havaitsemisraja (LOD)

QIASure Methylation Test -testin analyttinen herkkyys määritettiin 95 %:n havaitsemisrajana (95 % LOD). Havaitsemisrajan määrittämisessä käytettiin plasmidin sarjalaimennosta, joka sisälsi kaikki kolme amplikonisekvenssiä (*ACTB*, *FAM19A4* ja *hsa-mir124-2*; vaihteluväli 750 000–0,25 kopiota per PCR-ajo). Kohteiden 95 %:n havaitsemisrajaksi arvioitiin alhaisin plasmidin laimennos, joka tuotti vähintään 35 positiivista tulosta 36:sta ($C_T < 40$). Yhteensä tehtiin 12 testiä, joissa oli neljä eri käyttäjää (1 ajo/käyttäjä/päivä), kolme eri erää ja kolme eri RGQ-järjestelmää. Jokaisessa testissä testattiin 11 plasmidilaimennosta kolmesti. 95 %:n havaitsemisraja oli kaikissa kolmessa kohteessa 7,5 kopiota per PCR-ajo.

Lineaarisuus

QIASure-määrittäksen lineaarisuus arvioitiin 95 %:n havaitsemisrajan määrittämiseksi tehtyjen 12 testin tietojen perusteella. Testin kahdessa kohteessa (*FAM19A4* ja *hsa-mir124-2*) sekä vertailukohteessa (*ACTB*) lineaarisen monistumisen vaihteluväli oli 750 000–7,5 kopiota per PCR-ajo.

Tarkkuus

QIASure Methylation Test -testin tarkkuus määritettiin määrittäksen sisäisenä vaihteluna (joka tarkoittaa samat pitoisuudet sisältävien näytteiden useiden tulosten välistä vaihtelua samalla laitteella) ja määrittäksen kokonaisvarianssina (joka tarkoittaa useiden tulosten vaihtelua eri käyttäjien, laitteiden, erien ja laboratoriorien välillä). Testauksessa käytettiin korkean riskin HPV-positiivisesta kohdunkaulan irtosolunäytteestä saatua bisulfiittikonvertoitua DNA:ta, joka oli testissä todettu hypermetylaatiopositiiviseksi ja tuotti sekä *FAM19A4*:n että *hsa-mir124-2*:n osalta signaalin, joka vastasi noin 3 kertaa havaitsemisrajan pitoisuutta. Testissä tehtiin kahdennettuna 8 ajoa, joissa oli neljä eri käyttäjää (1 ajo/käyttäjä/päivä), kaksi eri erää ja kolme eri RGQ-järjestelmää kahdessa eri laboratoriossa, ja tulokseksi saatiin 16 datapistettä näytettä kohti. Testissä määritettiin C_T - ja $\Delta\Delta C_T$ -arvojen variaatiokerroin (coefficient of variation, CV) (taulukko 3).

Taulukko 3. CT- ja ΔΔCT-arvojen variaatiokerroin metylaatioposiitiivisessa kohdunkaulan irtosolunäytteessä

	Näytetyyppi	Näytetyyppi (%)	Näytetyyppi (%)
CT-arvo	Näytteen sisäinen laatukontrolli (ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
ΔΔCT-arvo	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Testatulla pitoisuudella näytteen CT-arvojen tilastollinen kokonaishajonta oli 1,32 % näytteen sisäisen laatukontrollin (ACTB) osalta, 1,52 % kohteen FAM19A4 osalta ja 1,64 % kohteen hsa-mir124-2 osalta. Testatulla pitoisuudella näytteen ΔΔCT-arvojen tilastollinen kokonaishajonta oli 5,97 % kohteen FAM19A4 osalta ja 5,75 % kohteen hsa-mir124-2 osalta.

Häiritsevät aineet

Mahdollisten PCR-vaikutusten perusteella valitut inhiboivat aineet olivat bisulfiittikonversiosarjan desulfonointi- ja pesupuskuri. Alkuperäisessä näytteessä mahdollisesti olevia aineita ei testattu, koska näytteen DNA puhdistetaan piioksidirakeilla kahdesti (alkuperäisestä näytteestä eristämisen ja bisulfiittikonversion jälkeen). Desulfonointi- ja pesupuskurijäämien havaittiin häiritsevän PCR-ajoa, mikä havaittiin näytteen sisäisen laatukontrollin virheellisestä testituloksesta.

Kliininen suorituskyky

HPV-positiiviset kohdunkaulan irtosolunäytteet*

QIASure Methylation Test -testin kliininen suorituskyky kohdunkaulan intraepiteeliaalisten neoplasioiden (CIN 3) ja kohdunkaulan syövän (CIN 3+) toteamisessa määritettiin EU:ssa tehdyssä retrospektiivisessä monikeskustutkimuksessa (13). QIASure Methylation Test -testi arvioitiin 2384 HPV-positiivisella kohdunkaulan seulontanäytteellä, jotka saatiin naisilta (ikä 29–76 vuotta) neljästä EU-maasta (Skotlanti, Slovenia, Tanska, Alankomaat) (13). Näytteet kerättiin PreservCyt- tai SurePath-säilytysaineeseen. Tutkimuspopulaatio koostui 2012 naisesta, joilla ei ollut mitään todisteita sairaudesta 2 vuoden seurannassa (lyhenne $\leq$ CIN 1), 124 naisesta, joilla oli CIN 2, 228 naisesta, joilla oli CIN 3, ja 20 naisesta, joilla oli syöpä. Kohdunkaulan irtosolunäytteistä eristettiin DNA, ja bisulfiittikonversioreaktion syötteenä (ZYMO Research -yhtiön EZ DNA Methylation Kit -sarja) käytettiin 250 ng DNA:ta. Tästä 250 ng:stä modifioitua DNA:ta PCR-ajossa käytettiin 20 % (mikä vastaa 50 ng:tä alkuperäistä kohde-DNA:ta per PCR-ajo). QIASure Methylation Test -testin kokonaispositiivisuusasteet ryhmiteltyinä kliinisen päätetapahtuman mukaan kerrotaan alla (taulukko 4).

Taulukko 4. QIASure Methylation Test -testin positiivisuusaste

Kliininen päätepiste	Fraktio	Positiivisuusaste (95 %:n luottamusväli)
$\leq$ 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)
Kohdunkaulan syöpä	19/20	95,0 % (70,7–99,3)

Korkean riskin HPV-positiivisten kohdunkaulan irtosolunäytteiden joukossa herkkyys CIN 3+ -asteen osalta on 78,6 % (195/248; 95 %:n luottamusväli: 73,1–88,3) ja QIASure Methylation Test -testin kokonaisspesifisyys oli 78,3 % (n = 2013; 95 %:n CI: 76–80). hrHPV-positiivisten, metylaationegatiivisten tulosten negatiivinen ennustearvo oli 99,9 % kohdunkaulan syövälle (N = 1694; 95 %:n CI: 99,6–99,99), 96,9 % CIN3+:lle (95 %:n CI: 96–98) ja 93,0 % CIN2+:lle (95 %:n CI: 92–94).

* Lääkärin ottamat kohdunkaulan irtosolunäytteet.

Lisäksi herkkyys kohdunkaulan syövälle arvioitiin maailmanlaajuisessa retrospektiivisessä monikeskustutkimuksessa 519 invasiivisella syövällä, joilla oli eri histotyypit yli 25 maasta (11). Kohdunkaulan irtosolunäytteistä eristettiin DNA, ja bisulfiittikonversioreaktion syötteenä (ZYMO Research -yhtiön EZ DNA Methylation Kit -sarja) käytettiin 250 ng DNA:ta. Tästä 250 ng:stä modifioitua DNA:ta PCR-ajossa käytettiin 20 % (mikä vastaa 50 ng:tä alkuperäistä kohde-DNA:ta per PCR-ajo). 510 syöpää 519:stä sai testistä positiivisen tuloksen QIASure Methylation test -testillä, mikä tarkoittaa positiivisuusastetta 98,3 % (95 %:n CI: 96,7–99,2), positiivisuusasteet ryhmiteltyinä histotyypin mukaan kerrotaan alla kohdassa Taulukko 5. QIASure Methylation Test -testin positiivisuusaste kohdunkaulan syövän näytteissä.

Taulukko 5. QIASure Methylation Test -testin positiivisuusaste kohdunkaulan syövän näytteissä

Klininen päätepiste	Fraktio	Positiivisuusaste (95 %:n luottamusväli)
Levyepiteelikarsinooma	313/318	98,4 % (96,4–99,5)
Adenokarsinooma	121/123	98,4 % (94,2–99,8)
Adenoskvaamooi solukarsinooma	42/42	100,0 % (91,6–100)
Harvinaiset syövän histotyypit	30/32	93,8 % (79,2–99,2)
Syövän histotyyppiä ei ole määritetty	4/4	100 % (39,8–100,0)

HPV-positiiviset itse otetut emättimen harjanäytteet

QIASure Methylation Test -testin kliininen suorituskyky kohdunkaulan intraepiteliaalisten neoplasoidien (CIN 3) ja kohdunkaulan syövän (CIN 3+) toteamisessa itse otetuista emättimen harjanäytteistä määritettiin testaamalla 247 korkean riskin HPV-positiivista emättimen irtosolunäytettä. Näytteistä 14:ssä (5,7 %) ACTB:n C_T-arvo oli suurempi kuin 26,4, ja ne määritettiin virheellisiksi. Kelvollisiksi määritetyt itse otetut harjanäytteet jakautuivat seuraavasti: 148 näytettä naisilta, joilla todettiin 18 kuukauden seurannassa ≤ CIN 1 -asteinen muutos, 24 näytettä, joissa CIN 2 -asteinen muutos, 50 näytettä, joissa CIN 3 -asteinen muutos, 8 näytettä, joissa levyepiteelikarsinooma ja 3 näytettä, joissa adenokarsinooma. Emättimen irtosolunäytteistä eristettiin DNA, ja bisulfiittikonversioreaktion syöteenä (ZYMO Research -yhtiön EZ DNA Methylation Kit -sarja) käytettiin 250 ng DNA:ta. Tästä 250 ng:stä bisulfiittikonvertoitua DNA:ta PCR-ajossa käytettiin 20 % (mikä vastaa 50 ng:tä alkuperäistä kohde-DNA:ta per PCR-ajo). QIASure Methylation Test -testin positiivisuusasteet kliinisen päätepisteen mukaan on esitetty alla (taulukko 6).

Taulukko 6. QIASure Methylation Test -testin positiivisuusasteet itse otetuissa emättimen harjanäytteissä

Kliininen päätepiste	Fraktio	Positiivisuusaste (95 %:n luottamusväli)
≤ 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)
Levyepiteelikarsinooma	8/8	100,0 % (63,1–100,0)
Adenokarsinooma	3/3	100,0 % (29,2–100,0)

Korkean riskin HPV-positiivisten itse otettujen emättimen harjanäytteiden joukossa herkkyys CIN 3+ -asteen osalta on 72,1 % (44/61; 95 %:n luottamusväli: 59,7–81,9) ja karsinooman osalta 100 % (11/11; 95 %:n luottamusväli: 72–100).*

* Huomautus: Kohteiden hypermetylaatio niiden naisten näytteissä, joilla on pitkälle edennyt CIN-leesio ja/tai kohdunkaulan syöpä, saattaa jäädä havaitsematta näytteenotossa tapahtuvan vaihtelun vuoksi (joka voi johtua esim. riittämättömästä näytteenotosta).

FAM19A4:n ja *hsa-mir124-2:n* suorituskyky pitkälle edenneiden muuntuvien CIN-leesioiden toteamisessa

Isäntäsolun promootorien metylaation analyysillä tunnistetaan spesifisti pitkälle edenneitä CIN-leesioita, joilla on syövän kaltainen metylaatioprofiili ja odotetusti suuri riski kehittyä syöväksi lyhyellä aikavälillä (7, 8). *FAM19A4:n* ja *hsa-mir124-2:n* promootorin hypermetylaation analyysin suorituskyky määritettiin testaamalla 29 korkean riskin HPV-positiivista näytettä naisilta, joilla oli pitkälle edennyt muutuva CIN 2/3-asteinen muutos, sekä 19 korkean riskin HPV-positiivista näytettä naisilta, joilla oli varhaisvaiheen muutuva CIN 2/3-asteinen muutos. Metylaatio liittyi erityisesti pitkälle edenneeseen sairauteen, ja kaikki pitkälle edenneet CIN 2/3 -asteiset leesiot (100 %: 29/29; 95 %:n luottamusväli: 88–100) määritettiin hypermetylaatioposiitivisiksi verrattuna 47 %:iin (9/19; 95 %:n luottamusväli: 27–69) aikaisista CIN 2/3 -asteisista leesiosta.

Robustisuus

QIASure Methylation Test -testin robustisuus määritettiin vertaamalla QIASure Methylation Test -testillä saatujen tulosten ja määrittelyn vain tutkimuskäyttöön tarkoitetulla versiolla (Research Use Only, RUO) saatujen tulosten yhtäpitävyyttä. Testauksessa käytettiin 10:stä suuren riskin HPV-positiivisesta kohdunkaulan irtosolunäytteestä saatua bisulfiittikonvertoitua genomista DNA:ta. Näytteistä 5 oli aiemmin todettu hypermetylaationegatiivisiksi molempien markkerien suhteen ja 5 metylaatioposiitivisiksi (eli vähintään toisen markkerin osalta). Kahdennetussa testauksessa oli neljä käyttäjää 8 ajossa (yksi ajo/käyttäjä/päivä), kaksi eri erää ja kolme eri Rotor-Gene Q MDx -laitetta kahdessa eri laboratoriossa. Kullekin näytteelle saatiin 16 datapistettä (taulukko 7).

Taulukko 7. QIASure Methylation Test -testin ja määrittelyn RUO-version välinen yhtäpitävyys

Näytteen numero	RUO-tulos	Yhtäpitävyys, laboratorio 1 verrattuna RUO-versioon	Yhtäpitävyys, laboratorio 2 verrattuna RUO-versioon
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)
Välisumma		92,5 % (37/40)	92,5 % (37/40)
6	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
7	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
8	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
9	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
10	Pos	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Välisumma		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Neljä viidestä aiemmin metylaationegatiiviseksi todetusta näytteestä oli 100-prosenttisesti yhtäpitäviä, kun QIASure Methylation Test -testiä käytettiin kummassakin laboratoriossa. Näytteen 3 yhtäpitävyysprosentti oli 62,5 % (5/8) kummassakin laboratoriossa. *FAM19A4*-kohteeseen liittyvä havaittu variaatio oli lähellä määrittelyn raja-arvoja. Metylaationegatiivisten näytteiden yleinen yhtäpitävyys oli 92,5 % (37/40).

Kaikki aiemmin metylaatioposiitivisiksi määritetyt 5 näytettä olivat 100-prosenttisesti yhtäpitäviä vertailumäärittelyn kanssa, joten yleinen yhtäpitävyys oli 100 % (40/40).

Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä

Protokolla "Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit -sarjalla" verifioitiin tekemällä 119:lle kohdunkaulan raaputusnäytteelle vertailuprotokolla (näytteestä aiemmin eristetyn DNA:n bisulfiittikonversio ja DNA:n määräkontrolli) ja QIASure Methylation Test -testi. Suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä tehdyn bisulfiittikonversion onnistumisaste käyttäen 2,5 %:n syötettä oli 95,8 % (114/119) ja kasvoi 100 %:iin, kun virheellisiksi määritetyt näytteet testattiin uudelleen käyttäen 10 %:n syötettä. QIASure Methylation Test -testin yhtäpitävyys kahden bisulfiittikonversioprotokollan välillä oli 90,8 % (108/119; kappa-kerroin 0,75).

Protokolla "Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä QIASymphony Bisulfite Kit -sarjalla" verifioitiin tekemällä 120:lle kohdunkaulan raaputusnäytteelle vertailuprotokolla (näytteestä aiemmin eristetyn DNA:n bisulfiittikonversio ja DNA:n määräkontrolli) ja QIASure Methylation Test -testi. Suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä tehdyn bisulfiittikonversion onnistumisaste käyttäen 2,5 %:n syötettä oli 94,2 % (113/120) verrattuna vertailuprotokollan 97,5 %:iin (117/120). QIASure Methylation Test -testin yhtäpitävyys kahden bisulfiittikonversioprotokollan välillä oli 94,7 % (107/113; kappa-kerroin 0,88).

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

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Symbolin selitys
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	In vitro -diagnostinen lääketieteellinen laite
	CE-IVD-merkintä
 <N>	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	Komponentit
	Sisältö
	Numero
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeen (käsikirja) versiota, ja n on versionumero
	GTIN-numero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja



Suojattava auringonvalolta



Katso käyttöohjeet



Huomio

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tuen sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support, soita ilmaisnumeroon 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon tai paikalliseen jälleenmyyjään (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
QIASure Methylation Test Kit	72 reaktioon: 2 pääseosta, 2 kalibraattoria.	616014
QIAAsymphony SP	QIAAsymphony- näytteenvalmistelumoduuli: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle (valinnainen automaattiseen eristykseen)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-sykleri ja tarkka sulamisanalysaattori, jossa 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle, asennuksen ja koulutuksen.	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-sykleri ja tarkka sulamisanalysaattori, jossa 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: Sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle. Ei sisällä asennusta ja koulutusta.	9002032

Tuote	Sisältö	Tuotenro
Rotor-Gene Q MDx:n tarvikkeet		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Alumiinilohko käsin tehtävään reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 kappaleelle 0,1 ml:n putkia	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
Rotor-Gene AssayManager – rutiinitestaukseen Rotor-Gene Q MDx -laitteilla		
Rotor-Gene AssayManager	Ohjelmisto rutiinitestaukseen Rotor-Gene Q- ja QIA Symphony RGQ -laitteilla; yhdellä lisenssillä varustettu ohjelmisto asennukseen yhdelle tietokoneelle	9022739

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tämä sivu on tarkoituksella jätetty tyhjäksi.

Asiakirjan muutoshistoria

Päiväys

Muutokset

R4, kesäkuu 2019

Tarkistettu työnkulkukaavio kohdassa Menetelmän toimintaperiaate; lisätty EpiTest Fast 96 Bisulfite Kit kohtaan Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen; tarkistettu tietoruuhi kohdassa Turvallisuustiedot; lisätty tiedot RGQ MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajasta; tarkistettu kohta Näytteen valmistelu; lisätty vianmäärittystietoja; lisätty osio Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä kohtaan Suorituskykyominaisuudet; päivitetty Kirjallisuusviitteet; päivitetty ulkoasu

R5, heinäkuu 2023

Lisätty QIAsymphony-instrumentit valinnaiseen eristykseen automaatioon ja QIAsymphony Bisulfite Kit -sarja materiaaliin Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen; korjattu näytteen valmisteluosiota; lisätty SurePath-säilytysaineen käyttö; korjattu kliinisen suorituskyvyn osiota. Lisätty taulukon 5 ja taulukon 6 otsikot.

QIASure Methylation Test -testin rajoitettu lisensissopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja lisäprotokollissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisäprotokollista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseisiä protokollia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin nimenomaisesti ilmoitettujen käyttöoikeuksien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä sarja ja/tai sen käyttö eivät loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi käännyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellon ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuiluista (asiantajapalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

QIASure Methylation Test -testin laillinen valmistaja on Self-screen B.V.

QIASure Methylation Test -testin valmistaja on Self-screen B.V. ja jakelija Euroopassa QIAGEN.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony®, digene®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN-ryhmä); BD®, SurePath® (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyt® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.).
Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

07-2023 HB-2304-005 1132288 © 2023 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com

