

srpanj 2023.

QIASure™ Methylation Test

Upute za uporabu (priručnik)



Verzija 1

Za uporabu s instrumentom Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM



616014

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

1132288HR

Sadržaj

Predviđena uporaba	4
Sažetak i objašnjenje.....	5
Načelo postupka	5
Uključeni materijali	7
Sadržaj kompleta	7
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	7
Upozorenja i mjere opreza	10
Sigurnosne informacije.....	10
Opće mjere opreza.....	10
Mjere opreza u vezi s profilom softvera AssayManager	12
Pohrana i rukovanje reagensima	13
Rukovanje ispitcima i pohrana ispitaka.....	14
Priprema uzoraka za uzorke pohranjene u mediju PreservCyt.....	16
Priprema uzoraka za uzorke pohranjene u mediju SurePath™	19
Opće preporuke za bisulfitnu konverziju	20
Protokol: PCR s pomoću testa QIASure Methylation Test na instrumentu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	21
Tumačenje rezultata	34
Vodič za rješavanje problema	38
Ograničenja	40
Radne značajke.....	42
Granica detekcije (LOD).....	42

Linearnost	42
Preciznost	42
Interferirajuće tvari	43
Kliničke radne značajke	44
Otpornost	47
Referencije	50
Simboli.....	52
Kontaktни podaci	53
Informacije za naručivanje.....	54
Povijest revizija dokumenta	57

Predviđena uporaba

QIASure Methylation Test (kat. br. 616014) multipleksno je real-time PCR ispitivanje specifično za metilaciju koje služi za detekciju hipermetilacije promotora gena *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*. Uzorci koji se mogu ispitati testom QIASure Methylation Test uključuju bisulfitno konvertiranu DNA izoliranu iz ispitaka prikupljenih na sljedeće načine:

- cervikalni ispitci prikupljeni uređajem *digene*® HC2 DNA Collection Device (prikuplja ih liječnik)
- cervikalni ispitci prikupljeni četkicom za prikupljanje i stavljeni u otopinu PreservCyt® Solution ili SurePath™ Solution (prikuplja ih liječnik)
- vaginalni ispitci prikupljeni četkicom za prikupljanje (samostalno prikupljanje).

Indikacije za upotrebu:

1. Kao kontrolni test za žene s pozitivnim rezultatom testa na humani papiloma virus (human papillomavirus, HPV), za utvrđivanje potrebe za upućivanje na kolposkopiju ili druge kontrolne zahvate.
2. Kontrolni test za žene s nalazom Papa testa koji je pokazao atipične pločaste stanice neodređenog značenja (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), za utvrđivanje potrebe za upućivanje na kolposkopiju ili druge kontrolne zahvate.

Ovaj je proizvod namijenjen za profesionalne korisnike, kao što su tehničari i djelatnici laboratorija koji su obučeni za obavljanje in vitro dijagnostičkih postupaka, tehnike molekularne biologije i rad na sustavu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

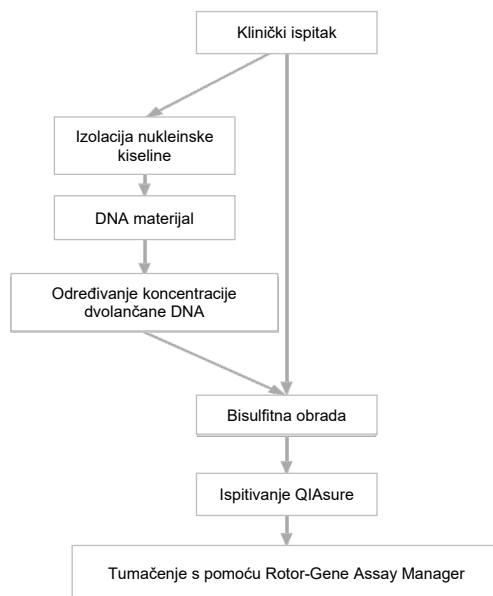
Sažetak i objašnjenje

Metilacija DNA je biokemijski postupak važan za normalni razvoj kod viših organizama (1). Uključuje dodavanje metilne skupine na 5. položaj pirimidinskog prstena nukleotida citozina. Abnormalni obrasci metilacije DNA također imaju veliku ulogu u karcinogenezi. U nekoliko vrsta humanih karcinoma i staničnih linija karcinoma, uključujući karcinom vrata maternice i karcinom endometrija, detektirana je hipermetilacija promotora gena *FAM19A4* (obitelj sa sličnošću sekvence 19, član A4 (sličan kemokinu (C-C motivu))) i/ili *hsa-mir124-2* (*homo sapiens micro RNA 124-2*) (2 – 6). Analiza metilacije promotora stanice domaćina specifično otkriva karcinom i „uznapredovali” stupanj lezija nazvanih cervikalna intraepitelna neoplazija (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) koje imaju profil metilacije sličan karcinomu i imaju veliki kratkoročni rizik od prelaska u karcinom (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). Ispitivanje QIASure omogućuje detekciju hipermetilacije promotora gena *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* na bisulfitno konvertiranoj DNA izoliranoj iz cervikalnih ili vaginalnih ispitaka uz uporabu ACTB-a (humanog gena β -aktina) kao interne kontrole kvalitete uzoraka.

Načelo postupka

QIASure Methylation Test multipleksni je real-time PCR test koji amplificira metilirane promotorske regije tumor supresorskih gena *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*, kao i fragment referentnog gena nespecifičan za metilaciju. Komplet sadržava 2 epruvete s QIASure Master Mix i 2 epruvete s QIASure Calibrator. Glavna mješavina namijenjena je za amplifikaciju bisulfitno konvertirane DNA pripremljene iz kliničkih ispitaka. Glavna mješavina sadržava početnice i probe za ciljne gene i referentni gen koji služi kao interna kontrola kvalitete uzoraka. Kalibrator je linearizirani plazmid koji sadrži sekvence gena *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* i ACTB amplikone.

Tijek rada



Ispitivanje QIAsure izvodi se na instrumentu Rotor-Gene Q MDx, a softver Rotor-Gene AssayManager® automatski izvodi analizu i tumačenje podataka. Vrijednost C_T (prag ciklusa) predstavlja broj PCR ciklusa potrebnih za detekciju fluorescentnog signala jačeg od pozadinskog signala, što je u korelaciji s brojem ciljnih molekula prisutnih u uzorku. Ispitivanje QIAsure izračunava vrijednost ΔC_T kao razliku između vrijednosti C_T ciljnih gena *FAM19A4* ili *hsa-mir124-2* i vrijednosti C_T referentnog gena (*ACTB*). ΔC_T relativna je kvantitativna vrijednost razine metilacije promotora gena *FAM19A4* ili *hsa-mir124-2*. U svrhu normalizacije, vrijednost ΔC_T uzorka kalibratora oduzima se od ΔC_T ciljnih gena *FAM19A4* ili *hsa-mir124-2* čime se dobiva vrijednost $\Delta\Delta C_T$ (9). Kalibrator je standardizirani uzorak plazmidne DNA s malim brojem kopija s poznatim brojem kopija triju ciljnih gena (tj., *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* i *ACTB*).

Uključeni materijali

Sadržaj kompleta

QIASure Methylation Test		72
Kataloški br.		616014
Broj reakcija		72
QIASure Master Mix (2 epruvete)	Smeđa epruveta	630 µL
QIASure Calibrator (2 epruvete)	Prozirna epruveta	25 µL
Upute za uporabu za QIASure Methylation Test (priručnik)		1

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheets, SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

Potrošni materijali i reagensi za pripremu uzoraka za samostalno prikupljene uzorke

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Reagensi za pripremu uzoraka pohranjenih u medij za prikupljanje SurePath.

- Buffer AL (QIAGEN, kataloški broj: 19075)

Potrošni materijali i reagensi za bisulfitnu konverziju

Potvrđeni kompleti za bisulfitnu konverziju uključuju:

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

Potrošni materijal za instrument Rotor-Gene Q MDx

- Strip tubes and Caps, 0,1 mL (kat. br. 981103)
- Pročišćena voda (npr., razreda čistoće za upotrebu u molekularnoj biologiji, destilirana ili deionizirana)

Oprema

- Prilagodljive pipete* namijenjene za PCR (1 – 10 µL; 10 – 100 µL)
- Rukavice za jednokratnu uporabu
- Stolna centrifuga* brzine >10.000 o/min
- Vrtložna miješalica*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, kat. br. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, kat. br. ND-3300) ili slično
- QIASymphony SP System (kat. br. 9001297) za neobaveznu automatiziranu ekstrakciju i/ili bisulfitnu konverziju

* Provjerite jesu li instrumenti pregledani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.

Oprema za real-time PCR

- Sustav Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (kat. br. 9002033) ili instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat. br. 9002032)*
- Softver Rotor-Gene AssayManager Core Application, verzija 1.0.x (pri čemu je x veće od ili jednako 4)
- Instaliran dodatak Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in, verzija 1.0.x (pri čemu je x veće od ili jednako 1)
- QIASure Assay Profile (iz datoteke AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (pri čemu je Y jednako ili veće od 1) za primjenu na bisulfitno konvertiranoj DNA dobivenoj iz cervikalnih ispitaka koje je prikupio liječnik
- Profil ispitivanja QIASure za ispitak samostalno prikupljen četkicom (iz datoteke AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (pri čemu je Y jednako ili veće od 0) za primjenu na bisulfitno konvertiranoj DNA dobivenoj iz vaginalnih ispitaka koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice

* Instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM s datumom proizvodnje od siječnja 2010. ili kasnijim. Datum proizvodnje možete saznati iz serijskog broja na stražnjoj strani instrumenta. Serijski broj ima format „mmggnnn“, pri čemu „mm“ označuje mjesec proizvodnje u brojkama, „gg“ označuje posljednje dvije brojke godine proizvodnje, a „nnn“ označuje jedinstveni identifikator instrumenta.

Upozorenja i mjere opreza

Samo za in vitro dijagnostičku uporabu.

Sigurnosne informacije

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-mjestu www.qiagen.com/safety. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list za svaki komplet QIAGEN® i komponentu kompleta.

QIASURE MASTER MIX



Sadržava: 1,2,4-triazol: Opasnost! Sumnja na moguće štetno djelovanje na plodnost ili mogućnost štetnog djelovanja na nerođeno dijete. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

Opće mjere opreza

Upotreba PCR testova zahtijeva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je usmjerena na molekularnu biologiju i usklađena s primjenjivim propisima i važećim normama.

Uvijek vodite računa o sljedećem:

- Nosite zaštitne rukavice za jednokratnu upotrebu bez pudera, laboratorijsku kutu i zaštitu za oči kada rukujete ispitcima.

- Spriječite kontaminaciju ispitka i kompleta mikrobima i nukleazama (DNaza). DNaza može uzrokovati degradaciju DNA predloška.
- Izbjegavajte kontaminaciju produkta DNA ili PCR uslijed prijenosa jer bi to moglo rezultirati lažno pozitivnim signalom.
- Uvijek upotrebljavajte vrške pipeta za jednokratnu upotrebu koji ne sadržavaju DNazu te imaju pregrade za aerosol.
- Reagensi za ispitivanje QIASure optimalno su razrijeđeni. Nemojte dodatno razrjeđivati reagense jer bi to moglo dovesti do smanjenja radnog učinka.
- Svi reagensi isporučeni uz komplet QIASure namijenjeni su za upotrebu s drugim reagensima isporučenima u istome kompletu. Nijedan reagens iz jednog kompleta nemojte zamijeniti istim reagensom iz drugog kompleta QIASure, čak ni ako je iz iste serije jer to može utjecati na rade značajke.
- Za dodatna upozorenja, mjere opreza i postupke pogledajte korisnički priručnik za instrument Rotor-Gene Q MDx.
- Prije prvog dnevnog postupka provedite zagrijavanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM na 95 °C u trajanju od 10 minuta.
- Promjena vremena inkubacije i temperatura može dovesti do pogrešnih ili neusklađenih podataka.
- Nemojte upotrebljavati dijelove kompleta kojima je istekao rok trajanja ili koji se bili nepravilno pohranjeni.
- Izlaganje komponenata svjetlosti svedite na najmanju moguću mjeru; reakcijske smjese mogu se izmijeniti uslijed izloženosti.
- Budite iznimno oprezni kako biste spriječili kontaminaciju smjesa sintetičkim materijalima sadržanima u reagensima PCR.
- Uklonite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.

Mjere opreza u vezi s profilom softvera AssayManager

Potrebni su različiti profili softvera AssayManager za različite vrste uzoraka. Pobrinite se da se upotrebljava ispravan profil za svaku vrstu uzorka koja će se ispitati, kako je navedeno u nastavku:

- „Profil ispitivanja QIASure za cervikalne brisove (iz datoteke AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)” mora se upotrebljavati za ispitivanje bisulfitno konvertirane DNA dobivene iz cervikalnih ispitaka koje je prikupio liječnik
- „Profil ispitivanja QIASure za ispitke samostalno prikupljene četkicom (iz datoteke AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)” mora se upotrebljavati za ispitivanje bisulfitno konvertirane DNA dobivene iz vaginalnih ispitaka koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice

Pohrana i rukovanje reagensima

Uvjeti transporta

QIASure Methylation Test transportira se na suhom ledu. Ako se bilo koja komponenta testa QIASure Methylation Test ne zamrzne po primitku, ili je vanjska ambalaža otvorena tijekom prijevoza, ili pošiljka ne sadržava otpremnicu, priručnike ili reagense, obratite se jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili lokalnim distributerima (pogledajte poledinu ili posjetite www.qiagen.com).

Uvjeti pohrane

QIASure Methylation Test potrebno je odmah nakon primitka pohraniti na temperaturi od –30 do –15 °C u zamrzivač s konstantnom temperaturom i zaštititi od svjetlosti.

Stabilnost

Kada je pohranjen u specificiranim uvjetima pohrane test QIASure Methylation Test stabilan je do isteka roka trajanja navedenog na naljepnici kutije.

Nakon otvaranja reagensi se mogu pohraniti u njihovom originalnom pakiranju na temperaturi od –30 do –15 °C. Ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje je potrebno izbjegavati. Nemojte premašivati maksimalan iznos od 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

- Lagano promiješajte sadržaj epruvete preokrećući je 10 puta i centrifugirajte sve epruvete prije otvaranja.
- Rokovi trajanja za svaki reagens naznačeni su na pojedinačnim naljepnicama komponenata. Ako je pohranjen u ispravnim uvjetima, proizvod će zadržati radne značajke koje se odnose na vrijeme stabilnosti dokle god se upotrebljavaju iste serije komponenata.

Rukovanje ispitcima i pohrana ispitaka

OPREZ



**Sa svim ispitcima potrebno je postupati kao s potencijalno
zaraznim materijalom.**

Cervikalni ispitci

Komplet QIAure služi za upotrebu s uzorcima bisulfitno konvertirane genomske DNA dobivenima iz cervikalnih ispitaka. Validirani mediji za prikupljanje za cervikalne ispitke (brisove) su medij za prikupljanje PreservCyt®, medij za prikupljanje SurePath™ i transportni medij za ispitke (Specimen Transport Medium, STM) *Digene*. Optimalna temperatura pohrane kliničkih uzoraka iznosi 2 – 8 °C nakon dostave u laboratorij. U tim uvjetima pohrane uzorci u mediju za prikupljanje PreservCyt ili SurePath™ stabilni su 3 mjeseca prije ekstrakcije DNA.

Napomena: cervikalni uzorci u STM-u mogu se otpremiti na temperaturi od 2 – 30 °C za noćnu dostavu u laboratorij u kojem se provodi testiranje i po primitku ponovno zamrznuti na –20 °C.

Vaginalni ispitci koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice

QIAure Methylation Test služi za upotrebu s uzorcima bisulfitno konvertirane genomske DNA ekstrahiranim iz vaginalnih ispitaka koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice. Vaginalni ispitci koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice mogu se prikupiti i otpremiti suhi te se po primitku u laboratoriju pohraniti u mediju za prikupljanje PreservCyt s preporučenim volumenom za pohranu od 2 – 3 ml. Uzorci u mediju za prikupljanje PreservCyt mogu biti pohranjeni na temperaturi od 2 – 8 °C ili na sobnoj temperaturi najdulje 3 mjeseca.

Uzorci genomske DNA

Nakon ekstrakcije genomske DNA, uzorci DNA mogu se pohraniti i isporučiti na temperaturi od $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do 12 mjeseci.

Priprema uzoraka za uzorke pohranjene u mediju PreservCyt

QIASure Methylation Test validiran je za upotrebu s uzorcima bisulfitno konvertirane genomske DNA dobivenima iz cervikalnih ispitaka. Bisulfitna konverzija genomske DNA može se provesti:

- i) s prethodnom ekstrakcijom DNA iz uzorka i kontrolom kvalitete DNA ili
- ii) izravno na cervikalnom ispitku s pomoću kompleta EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat. br. 59720) ili
- iii) izravno na cervikalnom ispitku s pomoću kompleta QIA Symphony Bisulfite Kit (QIAGEN, kat. br. 931106).

Naše su preporuke navedene u nastavku.

- **i) Bisulfitna konverzija s prethodnom ekstrakcijom DNA i kontrolom kvalitete DNA**

U tom je protokolu potrebno izvođenje ekstrakcije DNA i mjerenja koncentracije DNA, nakon čega slijedi alikvotiranje za dobivanje optimalnog volumena eluata prije započinjanja protokola bisulfitne konverzije, a potvrđen je za izvođenje s kompletima EZ DNA Methylation™ Kit (kat. br. D5001) i EZ DNA Methylation-Lightning Kit (kat. br. D5030) proizvođača ZYMO Research. Preporučujemo sljedeće metode:

- Ekstrakcija DNA
Standardni kompleti za ekstrakciju DNA (npr., kompleti na bazi kolona i kompleti na bazi magnetskih kuglica) kompatibilni su s testom QIA Sure Methylation Test.
- Mjerenje koncentracije DNA
Prije bisulfitne konverzije DNA izmjerite koncentraciju DNA. Prikladni sustavi za mjerenje koncentracija DNA su Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba proizvodi tvrtka Thermo Fisher Scientific) ili slični.

- Alikvotiranje eluata DNA

Optimalni ulazni volumen DNA za bisulfitnu konverziju u rasponu je od 100 ng do 2 µg, s preporučenim volumenom za bisulfitnu konverziju od 200 ng. Ako je koncentracija DNA preniska za bisulfitnu konverziju, ponovite ekstrakciju DNA s većim ulaznim volumenom kliničkog uzorka ili eluirajte DNA u manjem volumenu elucije.

- Bisulfitna konverzija s kompletima EZ DNA Methylation Kit i EZ DNA Methylation-Lightning Kit izvodi se u skladu s preporukama proizvođača.

Napomena: za EZ DNA Methylation Kit maksimalna količina uzorka DNA ne bi trebala premašivati 2 µg kako bi učinkovitost konverzije bila dovoljna (> 98 %).

- **ii) Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnom ispitku s pomoću kompleta EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit**

Bisulfitna konverzija koja se izvodi izravno na cervikalnom ispitku prikupljenom u PreservCyt® Solution potvrđena je za izvođenje s EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit proizvođača QIAGEN. Izvodi se prema protokolu iz *Priručnika za EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion* za uzorke DNA visoke koncentracije (1 ng – 2 µg) u skladu s preporukama proizvođača, osim za sljedeće:

- Korak 1. protokola. Uzmite 2,5 % cervikalnog ispitka u mediju za prikupljanje PreservCyt® (tj. 500 µL od 20 mL) i centrifugirajte 10 minuta na minimalno 3390 x g kako bi se odvojio talog. Bacite supernatant tako da ostane stanični talog pri maksimalno 20 µL medija za prikupljanje PreservCyt. Za reakciju bisulfitne konverzije upotrijebite taj uzorak staničnog taloga i nastavite s korakom 2. protokola proizvođača.
- Buffer BL: nemojte dodavati nosač RNA.
- Volumen elucije za bisulfitnu konverziju DNA iznosi 50 µL pufera Buffer EB za svaki uzorak.

- ***iii) Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnom ispitku s pomoću kompleta QIAAsymphony Bisulfite Kit***

Bisulfitna konverzija koja se izvodi izravno na cervikalnom ispitku prikupljenom u otopini PreservCyt® Solution potvrđena je za izvođenje s kompletom QIAAsymphony Bisulfite Kit proizvođača QIAGEN. **Vodimo se priručnikom za QIAAsymphony Bisulfite Kit i testiranje se izvodi u skladu s preporukama proizvođača.**

- Uzmite 2,5 % cervikalnog ispitka u mediju za prikupljanje PreservCyt® (tj. 500 µL od 20 mL) i centrifugirajte 10 minuta na minimalno 3390 x g kako bi se odvojio talog. Bacite supernatant tako da ostane stanični talog pri maksimalno 20 µL preostalog medija za prikupljanje PreservCyt.
- Za reakciju bisulfitne konverzije slijedite „List protokola za QIAAsymphony SP – Bisulfite 140_HC_V” (QIAAsymphony SP protocol sheet – Bisulfite 140_HC_V) počevši od koraka 2., a umjesto DNA upotrijebite stanični talog.
- Po završetku reakcije bisulfitne konverzije započnite proces SP na instrumentu QIAAsymphony slijedeći korake opisane u protokolu „Bisulfitna konverzija nemetiliranih citozina u različitim vrstama uzoraka” u priručniku za QIAAsymphony Bisulfite Kit. Elucija se izvodi u 40 µL.

Priprema uzoraka za uzorke pohranjene u mediju SurePath™

Uzorci pohranjeni u mediju SurePath moraju se prethodno obraditi prije ekstrakcije DNA. QIASure Methylation Test validiran je za upotrebu s uzorcima bisulfitno konvertirane genomske DNA dobivenima iz cervikalnih ispitaka u skladu s postupkom opisanim u nastavku.

- Uzmite 2,5 % cervikalnog ispitka.
- Centrifugirajte 10 minuta na 4000 g, uklonite supernatant, no ostavite 100 µL medija SurePath™.
- Dodajte 100 µL pufera AL i resuspendirajte talog.
- Dobro promiješajte i inkubirajte 20 minuta na 90 °C.
- Ohladite do sobne temperature tijekom 5 min.
- Izvedite ekstrakciju DNA s pomoću kompleta QIAamp DNA mini kit (ili sličnog) u skladu s proizvođačevim uputama, eluirajte DNA u 50 µL.
- Izmjerite koncentraciju DNA, prikladni sustavi su Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba proizvodi tvrtka Thermo Fisher Scientific) ili slični.
- Za bisulfitnu konverziju preporučuje se 200 ng DNA, a ako 200 ng nije dostupno, primijenite maksimalni ulazni volumen. Izvedite konverziju s pomoću kompleta EZ DNA methylation kit ili EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo) u skladu s proizvođačevim uputama. Upotrijebite 2,5 µL eluata za QIASure Methylation Test.

Opće preporuke za bisulfitnu konverziju

Reakcija bisulfitne konverzije treba se izvoditi u za to namijenjenom području odvojenom od područja na kojem se čuva i dispencira QIASure Master Mix, kako bi se izbjeglo kontaminiranje reagensa.

Ulazni volumen za QIASure reakciju je 2,5 µl bisulfitno konvertirane DNA.

Ako je interna kontrola kvalitete uzoraka negativna (tj. vrijednosti ACTB C_T su > 26,4), pripremom bisulfitno konvertirane DNA iz ispitka dobiven je materijal nedovoljne količine i/ili kvalitete i rezultat je nevažeći. Izvedite preporučene korake kako biste dobili vrijednost ACTB C_T koja je unutar važećeg raspona za sljedeće:

- Bisulfitna konverzija s prethodnom ekstrakcijom DNA i kontrolom količine DNA: Ponovite reakciju bisulfitne konverzije s većim ulaznim volumenom uzorka DNA i/ili ponovite izolaciju DNA s većim ulaznim volumenom cervikalnog ispitka
- Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnom ispitku: Ponovite reakciju bisulfitne konverzije s 10 %* cervikalnog ispitka u mediju za prikupljanje PreservCyt (tj. 2 mL od 20 mL).

Bisulfitno konvertirana DNA može se čuvati do 24 sata na temperaturi od 2–8 °C, do 5 dana na temperaturi od –25 do –15 °C i do 3 mjeseca na temperaturi nižoj od –70 °C. Uvijek treba izbjegavati ponavljanje ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja bisulfitno konvertirane DNA. Kako bi se zadržala odgovarajuća kvaliteta, ne bi trebalo biti više od tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

* Volumen uzorka za izravnu bisulfitnu konverziju može se povećati kada je stopa uspjeha nezadovoljavajuća zbog varijabilnosti uzorkovanja, npr. kao rezultat neodgovarajućeg uzorkovanja.

Protokol: PCR s pomoću testa QIASure Methylation Test na instrumentu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*

Važne točke prije započinjanja

- Uzmite si vremena kako biste se upoznali s radom instrumenta Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM prije nego što započnete s protokolom. Proučite korisnički priručnik instrumenta (kat. br. 9002033 ili 9002032).
- Prije prvog dnevnog postupka provedite zagrijavanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na 95 °C u trajanju od 10 minuta.
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 omogućuje automatsko tumačenje rezultata PCR-a. Komplet QIASure mora se obrađivati na instrumentu Rotor-Gene Q MDx uz primjenu softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0. Uzmite si dovoljno vremena kako biste se upoznali sa softverom Rotor-Gene AssayManager v1.0 (kat. br. 9022739) i dodatkom Epsilon Plug-In te proučite korisničke priručnike za oba programa.
- Potrebni su različiti profili ispitivanja softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0 za različite vrste uzoraka. Pobrinite se da se upotrebljava ispravan profil za svaku vrstu uzorka koja će se ispitati, kako je navedeno u nastavku:
 - „Profil ispitivanja QIASure za cervikalne brisove (iz datoteke AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)” mora se upotrebljavati za ispitivanje bisulfitno konvertirane DNA dobivene iz cervikalnih ispitaka koje je prikupio liječnik
 - „Profil ispitivanja QIASure za ispitke samostalno prikupljene četkicom (iz datoteke AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)” mora se upotrebljavati za ispitivanje bisulfitno konvertirane DNA dobivene iz vaginalnih ispitaka koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice

* Instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM s datumom proizvodnje od siječnja 2010. ili kasnijim. Datum proizvodnje možete saznati iz serijskog broja na stražnjoj strani instrumenta. Serijski broj ima format „mmggnnn”, pri čemu „mm” označuje mjesec proizvodnje u brojkama, „gg” označuje posljednje dvije brojke godine proizvodnje, a „nnn” označuje jedinstveni identifikator instrumenta.

Napomena: može se ispitati samo jedna vrsta uzorka po eksperimentu. Pojedinačni profili ispitivanja optimizirani su za svaku vrstu uzorka i neophodno je da korisnici odaberu ispravan profil ispitivanja za dobivanje optimalnih rezultata za svaku specifičnu vrstu uzorka.

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Softver Rotor-Gene AssayManager, verzija v1.0.x (pri čemu je x veće od ili jednako 4) mora se instalirati na računalo povezano s instrumentom Rotor-Gene Q MDx. Za pojedinosti o instaliranju softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application pogledajte *Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application*.
 - Za test QIAure Methylation Test potreban je specifičan dodatak koji se naziva „Epsilon Plug-in” (verzija 1.0.1 ili novija). Taj se dodatak može preuzeti s internetske stranice tvrtke QIAGEN: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Dodatak se mora instalirati na računalo na kojem je već instaliran softver Rotor-Gene AssayManager, verzija 1.0.x (pri čemu je x veće od ili jednako 4).
 - Za obradu testa QIAure Methylation Test s pomoću softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0 potreban je profil specifičan za ispitivanje. Profil ispitivanja sadrži sve parametre potrebne za cikliranje i analizu eksperimenta. Na raspolaganju su 2 profila QIAure Assay Profile:
 - Profil ispitivanja „QIAure za cervikalne brisove” (iz datoteke AP_QIAure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) namijenjen je za cervikalne ispitke koje prikuplja liječnik
 - Profil ispitivanja „QIAure za ispitke samostalno prikupljene četkicom” (iz datoteke AP_QIAure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) namijenjen je za vaginalne ispitke koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice. Profili se mogu preuzeti s internetske stranice za QIAure Methylation Test: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiaure-methylation-test-kit-eu/>. Profil ispitivanja treba se uvesti u softver Rotor-Gene AssayManager.
- Napomena:** obrada kompleta QIAure moguća je samo ako su određene konfiguracijske postavke namještene u softveru Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Za sigurnost postupka u cijelom sustavu treba postaviti sljedeće konfiguracijske postavke za zatvoreni način:

- „Material number required” (Potreban broj materijala)
- „Valid expiry date required” (Potreban je važeći datum isteka roka trajanja)
- „Lot number required” (Potreban broj serije)

Instalacija dodatka Epsilon Plug-in i uvoz profila ispitivanja

Pojedinosti o instalaciji i uvozu dodatka Epsilon Plug-in i profila ispitivanja navedene su u *Korisničkom priručniku za Rotor-Gene AssayManager Core Application* i *Korisničkom priručniku za Epsilon Plug-In*.

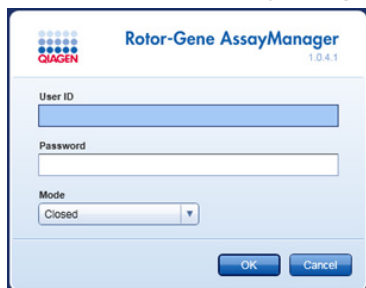
- Preuzmite dodatak Epsilon Plug-in i najnoviju verziju profila QIASure Assay Profile s web-mjesta tvrtke QIAGEN.
- Pokrenite postupak instalacije tako da dvaput kliknete datoteku **EpsilonPlugin.Installation.msi** i pridržavate se uputa za instalaciju. Za detaljan opis postupka pogledajte odjeljak „Instalacija dodataka” u *Korisničkom priručniku za AssayManager Core Application*.

Napomena: za sigurnost postupka u cijelom sustavu odaberite karticu **Settings** (Postavke) i označite okvire **Material number required** (Potreban broj materijala), **Valid expiry date required** (Potreban je važeći datum isteka roka trajanja) i **Lot number required** (Potreban broj serije) za zatvoreni način (odjeljak s radnim popisima). Ako te postavke nisu omogućene (označene), kliknite na njih kako biste ih omogućili.

- Nakon uspješne instalacije dodatka osoba s administratorskim pravima za softver Rotor Gene AssayManager treba uvesti profil ispitivanja AP_QIASure_V1_0_Y.iap na način naveden u nastavku.

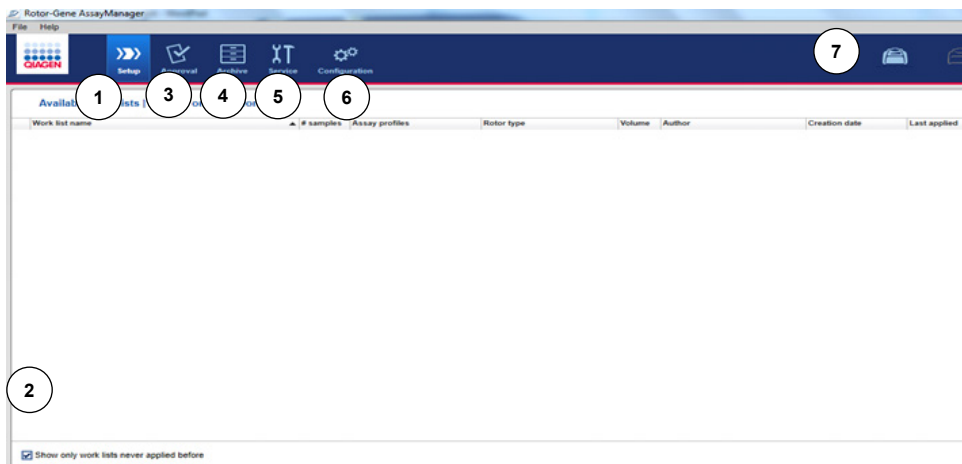


1. Otvorite softver Rotor-Gene AssayManager klikom na njegovu ikonu.  Otvara se prozor Rotor-Gene AssayManager (pogledajte Sliku 1).



Slika 1. Zaslona za prijavu u Rotor-Gene AssayManager.

2. Prijavite se u Rotor-Gene AssayManager sa svojim korisničkim ID-jem i lozinkom. Nemojte mijenjati način „Closed” (Zatvoreno). Kliknite **OK** (U redu). Otvara se zaslon Rotor-Gene Assay Manager (pogledajte sliku u nastavku).



- 1 Kartica **Set-up** (Postavljanje). U toj kartici možete upravljati radnim popisima ili ih primijeniti.
- 2 Označavanjem okvira primijenjenih radnih popisa prikazuju se samo novi radni popisi.
- 3 Kartica **Approval** (Odobrenje). U toj kartici možete pronaći prethodne eksperimente (postupke).
- 4 Kartica **Archive** (Arhiva). U njoj možete pronaći stare eksperimente (postupke) koji su već odobreni.

- 5 Kartica **Service** (Servis). U njoj se prikazuje izvješće sa zapisom o nadzoru za svaku datoteku koju generira softver
- 6 Kartica **Configuration** (Konfiguracija). Omogućuje vam konfiguraciju svih parametara softvera
- 7 Ikone instrumenta Rotor-Gene Q MDx.



Nije povezano



Povezano

3. Odaberite konfiguracijsko okruženje.
4. Odaberite karticu **Assay Profiles** (Profili ispitivanja).
5. Kliknite **Import** (Uvoz).
6. U dijaloškom okviru odaberite profil ispitivanja
 AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap za cervikalne ispitke i/ili profil ispitivanja
 AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap za uvoz i kliknite **Open** (Otvori).
7. Nakon uspješnog uvoza profila ispitivanja može se upotrebljavati u okruženju „Setup” (Postavljanje).

Napomena: ista verzija profila ispitivanja ne može se uvesti dvaput.

Obrada uzoraka na instrumentima Rotor-Gene Q MDx s rotorom sa 72 položaja

U istom je postupku (eksperimentu) moguće testirati do 70 uzoraka bisulfitno konvertirane DNA, uz kalibrator i kontrolu bez predloška. Shema u Tablici 1 primjer je postavljanja bloka za postavljanje ili rotora za postupak s testom QIASure Methylation Test. Brojevi označavaju položaje u bloku za postavljanje i konačan položaj na rotoru.

Tablica 1. Postavljanje ploče i rotora za postupak s kompletom QIASure na instrumentu Rotor-Gene Q MDx

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

OPREZ



Epruvete se moraju umetnuti u rotor kao što je navedeno u Tablici 1. Automatska analiza postavljena u profilu ispitivanja temelji se na toj organizaciji. Ako se upotrebljava drugačiji raspored, bit će dobiveni pogrešni rezultati.

Napomena: sve neupotrijebljene položaje napunite praznim epruvetama.

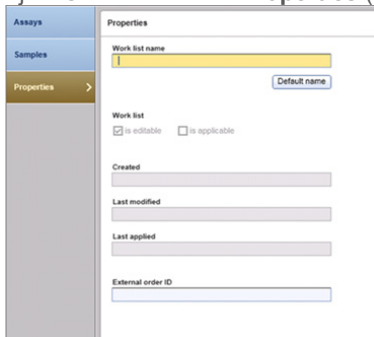
PCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx s rotorom za 72 epruvete

Prije prvog dnevnog postupka provedite zagrijavanje instrumenta Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM na 95 °C u trajanju od 10 minuta.

1. Izradite radni popis za uzorak koji će se obrađivati na sljedeći način:

- 1a. Uključite instrument Rotor-Gene Q MDx.
- 1b. Otvorite softver Rotor-Gene AssayManager i prijavite se kao korisnik u ulogu rukovatelja u zatvorenom načinu.
- 1c. Kliknite **New work list** (Novi radni popis) u upravitelju radnim popisima (okruženje „Setup” (Postavljanje)).
- 1d. Odaberite **QIASure assay profile** s popisa dostupnih profila ispitivanja.
Napomena: profil ispitivanja AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap namijenjen je za cervikalne ispitke; profil ispitivanja AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap namijenjen je za vaginalne uzorke samostalno prikupljene četkicom.
Napomena: može se ispitati samo jedna vrsta uzorka po eksperimentu.
- 1e. Kliknite **Move** (Premjesti) kako biste prenijeli odabrani profil ispitivanja na popis **Selected assay profiles** (Odabrani profili ispitivanja). Profil ispitivanja sada bi se trebao prikazivati na popisu „Selected assay profiles” (Odabrani profili ispitivanja).
- 1f. Unesite broj uzoraka u odgovarajuće polje.
- 1g. Unesite sljedeće informacije o kompletu QIASure kit otisnute na poklopcu kutije.
 - Broj materijala: 1102417
 - Važeći datum isteka roka trajanja u formatu GGGG-MM-DD
 - Broj serije
- 1h. Odaberite korak **Samples** (Uzorci). Popis s pojedinostima o uzorku prikazat će se na zaslonu AssayManager. Popis predstavlja očekivani raspored rotora.
- 1i. Za svaki uzorak unesite identifikacijske brojeve uzoraka na popis, kao i sve opcionalne informacije o uzorku.

1j. Odaberite korak **Properties** (Svojstva) i unesite naziv radnog popisa (Slika 2).



Slika 2. Properties (Svojstva)

1k. Potvrdite je li potvrdni okvir **primjenjiv** pa kliknite **Apply** (Primijeni).

1l. Spremite radni popis.

Radni popis može se ispisati, što može pomoći s pripremom i postavljanje PCR-a. Za ispis radnog popisa kliknite **Print work list** (Ispis radnog popisa). Pojediniosti o uzorku uključene su u radni popis.

Napomena: radni popis može se izraditi nakon što je na instrumentu postavljen postupak ili se može spremiti prije dodavanja uzoraka na instrument.

2. Postavite postupak QIASure.

Da biste rizik od kontaminacije PCR reakcije sveli na najmanju moguću mjeru, preporučuje se upotreba PCR ormarića s mogućnošću UV zračenja.

Dispenziranje QIASure Master Mix mora se obavljati u području odvojenom od područja gdje se obavlja reakcija bisulfitne konverzije DNA.

Očistite klupu, pipete i nosač za epruvete prije upotrebe s otopinom za degradaciju DNA kako biste spriječili kontaminaciju predloška ili nukleaze.

Napomena: mijenjajte vrške između svake epruvete kako biste izbjegli nespecifične kontaminacije predloška ili reakcijske smjese, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

2a. Potpuno odmrznite QIASure Master Mix i QIASure Calibrator te zaštitite QIASure Master Mix od svjetlosti kad god je to moguće.

Napomena: pobrinite se da korak odmrzavanja ne traje dulje od 30 minuta kako bi se izbjegla degradacija materijala.

2b. Lagano promiješajte okretanjem 10 puta, a zatim kratko centrifugirajte prije upotrebe.

2c. Dispenzirajte 17,5 µL mješavine QIASure Master Mix spremne za upotrebu u odgovarajuće strip epruvete. Postavljanje reakcije može se obavljati na sobnoj temperaturi.

2d. Vratite QIASure Master Mix u zamrzivač kako biste izbjegli bilo kakvu degradaciju materijala.

2e. Prenesite epruvete u odvojeno područje za dispenziranje kontrola za ispitivanje i bisulfitno konvertiranih uzoraka.

2f. Dodajte 2,5 µL vode u **kontrolu bez predloška (no template control, NTC)** na položaju 2 (pogledajte Tablicu 1 gore). Lagano promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskanjem iz nje.

2g. Dodajte 2,5 µL kalibratora QIASure Calibrator na položaj 1 (pogledajte Tablicu 1 gore). Lagano promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskanjem iz nje i zatvorite epruvetu čepom.

2h. Dodajte 2,5 µL bisulfitno konvertirane DNA u odgovarajuću epruvetu. Lagano promiješajte uvlačenjem u pipetu i istiskanjem iz nje.

2i. Kad napunite komplet od 4 epruvete, začepite epruvete.

Napomena: PCR epruvete mogu se pohraniti na 30 minuta između pipetiranja uzoraka u PCR epruvete i početka eksperimenta na stroju na temperaturi od 2–8 °C u mraku.

2j. Vratite QIASure Calibrator u zamrzivač kako biste izbjegli bilo kakvu degradaciju materijala.

Napomena: mijenjajte vrške između svake epruvete kako biste izbjegli nespecifične kontaminacije predloška ili reakcijske smjese, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

3. Pripremite instrument Rotor-Gene Q MDx i započnite s postupkom (eksperimentom) kako slijedi:

- 3a. Postavite rotor sa 72 jažice u držač rotora.
- 3b. Napunite rotor strip epruvetama prema dodijeljenim položajima, počevši s položajem 1, kako je prikazano u Tablici 1, sa začepljenim praznim strip epruvetama postavljenima na sve neupotrijebljene položaje.

Napomena: pobrinite se da je prva epruveta umetnuta u položaj 1 i da su strip epruvete postavljene tako da su ispravno okrenute i da se nalaze na ispravnim položajima kako je prikazano u Tablici 1.

- 3c. Pričvrstite prsten za zaključavanje.
- 3d. Postavite rotor i prsten za zaključavanje na instrument Rotor-Gene Q MDx i zatvorite poklopac instrumenta.
- 3e. U softveru Rotor-Gene AssayManager v1.0 odaberite odgovarajući radni popis u upravitelju radnim popisima i kliknite **Apply** (Primijeni) ili ako je taj radni popis još otvoren, kliknite **Apply** (Primijeni).

Napomena: ako radni popis za postupak nije izrađen, prijavite se u softver Rotor-Gene AssayManager v1.0 i slijedite korak 1. prije nastavka s radom.

- 3f. Unesite naziv postupka (eksperimenta).
- 3g. Na popisu **Cycler selection** (Odabir ciklera) odaberite cikler koji će se upotrebljavati.
- 3h. Provjerite je li prsten za zaključavanje pravilno pričvršćen i na zaslonu potvrdite da je prsten za zaključavanje pričvršćen.
- 3i. Kliknite **Start experiment** (Pokreni eksperiment).
Postupak s testom QIASure Methylation Test trebao bi početi.

4. Kada postupak završi, kliknite **Finish run** (Završi postupak).

5. Izdajte i odobrite postupak.

- Korisnici prijavljeni s ulogom Approver (Davatelj odobrenja) trebaju kliknuti **Release and go to approval** (Izdaj i idi na odobrenje).
- Korisnici prijavljeni s ulogom Operator (Rukovatelj) trebaju kliknuti **Release** (Izdaj).

6. Izdajte rezultate.

- Ako ste kliknuli **Release and go to approval** (Izdaj i idi na odobrenje), prikazuju se rezultati eksperimenta.
- Ako je korisnik s ulogom rukovatelja kliknuo **Release** (Izdaj), korisnik s ulogom „Approver” (Davatelj odobrenja) treba se prijaviti i odabrati okruženje „Approval” (Odobrenje).
- Filtrirajte ispitivanje koje treba odobriti odabirom mogućnosti filtriranja i klikom na **Apply** (Primijeni).
- Pregledajte rezultate i odobrite rezultate za svaki uzorak za test.

U tablici „Results” (Rezultati) listajte do uzorka koji treba odobriti. Svaki rezultat za uzorak koji treba odobriti ima tri izborna gumba na kraju odgovarajućeg retka.

Odaberite **accept** (prihvati) ili **reject** (odbaci) za rezultat za uzorak.

Napomena: rezultat koji je softver Rotor-Gene AssayManager automatski postavio kao **INVALID** (NEVAŽEĆI) više se ne može vratiti u važeći rezultat, čak ni ako je rezultat odbačen.

Opcionalno: Unesite komentar u stupac Sample comment (Komentar o uzorku).

- Kliknite **Release/Report data** (Izdaj/prijavi podatke).
- Kliknite **OK** (U redu). Izradit će se izvješće u formatu Adobe Portable Document format (.pdf) i automatski će se spremi u unaprijed definiranu mapu. Prema zadanim postavkama, put mape je sljedeći: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports**

Napomena: taj put i mapa mogu se promijeniti u okruženju „Configuration” (Konfiguracija).

- Idite u karticu **Archive** (Arhiva) za izvoz .rex datoteke koja odgovara neobrađenim podacima. Pronađite eksperiment primjenom odgovarajuće mogućnosti filtriranja i kliknite **show assays** (prikaži ispitivanja). Zatim kliknite **Export .rex file** (Izvoz .rex datoteke) i spremite odabir klikom na **OK** (U redu). Softver automatski sprema .rex datoteku u sljedeću unaprijed definiranu mapu: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**

Napomena: taj put i mapa mogu se promijeniti u kartici **Specify the .rex file export destination** (Odredi odredište za izvoz .rex datoteke).

Napomena: paket podrške iz postupka potreban je za rješavanje problema. Paketi podrške mogu se generirati u okruženju za odobrenje ili arhiviranje. Pogledajte *Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager Core Application*, Rješavanje problema, „Izrada paketa podrške” na <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Osim toga, od koristi bi mogao biti i zapis o nadzoru iz vremena incidenta ± 1 dan. Zapis o nadzoru može se dohvatiti iz okruženja Service (Servis) (*Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Ispraznite instrument Rotor-Gene Q MDx i odložite strip epruvete u otpad u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.

Tumačenje rezultata

Analiza je potpuno automatizirana.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 prvo analizira amplifikacijske krivulje i nesukladne krivulje može označiti kao nevažeće, ovisno o njihovom obliku i amplitudi šuma. U tom slučaju, nevažećoj krivulji pridružit će se oznaka (pogledajte Tablicu 2).

Rotor-Gene AssayManager v1.0 zatim će analizirati kontrole postupka.

- Kalibrator
- NTC (Kontrola bez predloška)

Napomena: izvješće generirano na kraju postupka prikazuje rezultate dobivene kontrolama postupka s oznakama nevažećih uzoraka ispred nevažećih podataka.

Ako se sve kontrole postupka podudaraju, Rotor-Gene AssayManager analizirat će nepoznate uzorke.

Tablica 2. prikazuje oznake nevažećih uzoraka koje se mogu dodijeliti pojedinoj epruveti tijekom analize softverom Rotor-Gene AssayManager v1.0, zajedno s objašnjenjem značenja svake oznake.

Tablica 2. Oznake nevažećih uzoraka i opisi pojmova

Oznaka	Ponašanje	Opis
„ABOVE_ACCEPTED_RANGE” (Iznad prihvatljivog raspona)	Invalid (Nevažeće)	Ciljna vrijednost veća je od definiranog raspona. To može biti C_T , fluorescencija krajnje točke, koncentracija ili izračunata vrijednost, npr. srednja vrijednost C_T ili ΔC_T .
„ASSAY_INVALID” (Ispitivanje nevažeće)	Invalid (Nevažeće)	Ispitivanje je nevažeće jer je barem jedna vanjska kontrola nevažeća.
„BELOW_ACCEPTED_RANGE” (Ispod prihvatljivog raspona)	Invalid (Nevažeće)	Ciljna vrijednost manja je od definiranog raspona. To može biti C_T , fluorescencija krajnje točke, koncentracija ili izračunata vrijednost, npr. srednja vrijednost C_T ili ΔC_T .
„CONSECUTIVE_FAULT” (Uzastopna pogreška)	Invalid (Nevažeće)	Ciljni gen koji se upotrebljavao za izračun ove ciljne vrijednosti nevažeći je.
„CURVE_SHAPE_ANOMALY” (Anomalija oblika krivulje)	Invalid (Nevažeće)	Amplifikacijska krivulja neobrađenih podataka prikazuje oblik koji odstupa od utvrđenog ponašanja ovog ispitivanja. Postoji velika vjerojatnost netočnih rezultata ili pogrešnog tumačenja rezultata.
„FLAT_BUMP” (Ravna izbočina)	Invalid (Nevažeće)	Amplifikacijska krivulja neobrađenih podataka prikazuje oblik ravne izbočine koji odstupa od utvrđenog ponašanja ovog ispitivanja. Postoji velika vjerojatnost netočnih rezultata ili pogrešnog tumačenja rezultata (npr. određivanje pogrešne vrijednosti C_T -a).
„IN_ACCEPTED_RANGE” (U prihvatljivom rasponu)	Valid (Važeće)	NTC prikazuje signalne vrijednosti C_T veće od 36 za ciljni gen ACTB.
„INVALID_CALCULATION” (Nevažeći izračun)	Invalid (Nevažeće)	Izračun za ovaj ciljni gen nije uspio.
„MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING” (Više prelazaka pragova)	Invalid (Nevažeće)	Amplifikacijska krivulja prelazi prag više od jednom. Ne može se odrediti nedvosmislena vrijednost C_T .
„NO_BASELINE” (Nema početne vrijednosti)	Invalid (Nevažeće)	Nije pronađena početna vrijednost za početnu osnovnu liniju.
„NO_CT_DETECTED” (CT nije utvrđen)	Varijabla	Za ovaj ciljni gen nije utvrđena vrijednost C_T .
„NO_VALUE” (Nema vrijednosti)	Invalid (Nevažeće)	Za cilj nije dobivena vrijednost, ali očekivalo se da će biti dobivena. Ta vrijednost ne mora biti unutar određenog raspona. To može biti C_T , fluorescencija krajnje točke, koncentracija ili izračunata vrijednost (npr. srednja vrijednost C_T ili ΔC_T).
„NORM_FACTOR_ALTERATION” (Izmjena normalizacijskog faktora)	Warning (Upozorenje)	Odstupanje tijekom postupka normalizacije. Amplifikacijska krivulja prikazuje se sa zadanom normalizacijom; trebalo bi ručno provjeriti ispravnost rezultata.

Tablica 2. Oznake nevažećih uzoraka i opisi pojmova

„OTHER_TARGET_INVALID” (Druga ciljna vrijednost nevažeća)	Invalid (Nevažeće)	Druga ciljna vrijednost za isti uzorak nevažeća je.
„SATURATION” (Saturacija)	Invalid (Nevažeće)	Došlo je do snažne saturacije fluorescencije neobrađenih podataka prije točke otklona na amplifikacijskoj krivulji.
„SATURATION_IN_PLATEAU” (Saturacija u platou)	Warning (Upozorenje)	Došlo je do saturacije fluorescencije neobrađenih podataka u plato fazi na amplifikacijskoj krivulji.
„SPIKE” (Nagli porast)	Warning (Upozorenje)	Nagli porast u fluorescenciji neobrađenih podataka detektiran je na amplifikacijskoj krivulji, ali izvan područja gdje se određuje vrijednosti C_T .
„SPIKE_CLOSE_TO_CT” (Nagli porast u blizini C_T -a)	Invalid (Nevažeće)	Nagli porast je detektiran na amplifikacijskoj krivulji u blizini vrijednosti C_T .
„STEEP_BASELINE” (Snažan rast osnovne linije)	Invalid (Nevažeće)	Snažan rast osnovne linije za fluorescenciju neobrađenih podataka detektiran je na amplifikacijskoj krivulji.
„STRONG_BASELINE_DIP” (Velik pad osnovne linije)	Invalid (Nevažeće)	Velik pad osnovne linije za fluorescenciju neobrađenih podataka detektiran je na amplifikacijskoj krivulji.
„STRONG_NOISE” (Jak šum)	Invalid (Nevažeće)	Detektiran jak šum izvan faze rasta amplifikacijske krivulje.
„STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE” (Jak šum u fazi rasta)	Invalid (Nevažeće)	Detektiran jak šum unutar faze rasta (eksponencijalne faze) amplifikacijske krivulje.
„UNCERTAIN” (Neizvjesno)	Varijabla	Rezultati iz AUDAS nepodudarni su s rezultatima osnovne analize. Nedvosmislena automatska procjena valjanosti podataka nije moguća.
„UNEXPECTED_CT_DETECTED” (Detektiran neočekivani C_T)	Varijabla	Vrijednost C_T detektirana je za cilj koji se ne bi trebao amplificirati.
„UNEXPECTED_VALUE” (Neočekivana vrijednost)	Invalid (Nevažeće)	Za cilj je dobivena vrijednost, ali nije se očekivalo da će biti dobivena. To može biti C_T , fluorescencija krajnje točke, koncentracija ili izračunata vrijednost, npr. srednja vrijednost C_T ili ΔC_T .
„UPSTREAM” (Prethodni postupak)	Varijabla	Status uzorka postavljen je na Invalid (Nevažeće) ili Unclear (Nejasno) u prethodnom postupku (npr. QIAasympphony). Napomena: za uzorke koji su označeni kao nejasni, ponašanje softvera Rotor-Gene AssayManager definirano je u okruženju „Configuration” (Konfiguracija) softvera AssayManager. Oznake „Invalid” (Nevažeće) iz prethodnih postupaka uvijek će dovesti do nevažećeg rezultata odgovarajućeg uzorka u Rotor-Gene AssayManager.
„WAVY_BASE_FLUORESCENCE” (Valovita osnovna linija za fluorescenciju)	Invalid (Nevažeće)	Valovita osnovna linija za fluorescenciju neobrađenih podataka detektirana na amplifikacijskoj krivulji.

- Ako su sve kontrole postupka važeće, Rotor-Gene AssayManager v1.0 analizirat će nepoznate uzorke. Kako bi se rezultati mogli protumačiti, u uzorku mora biti prisutna minimalna količina bisulfitno konvertirane DNA. Na to ukazuje vrijednost C_T konstitutivnog gena ACTB, koja mora biti $\leq 26,4$ kako bi Rotor-Gene AssayManager validirao uzorak.
- Vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ za *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* zatim će se izračunati i bit će dobiven rezultat. Ako je vrijednost $\Delta\Delta C_T$ ispod granične vrijednosti, rezultat za ciljni gen je „Hypermethylation positive” (Pozitivan na hipermetilaciju).

Napomena: djelomične ili niske razine metilacije prirodan su fenomen koji, za razliku od hipermetilacije, nije izravno povezan s razvojem karcinoma.

- Uzorak se smatra „Hypermethylation positive” (Pozitivan na hipermetilaciju) kada je rezultat za barem jedan ciljni gen „Hypermethylation positive” (Pozitivan na hipermetilaciju).
- Uzorci s niskom kvalitetom/količinom DNA (tj., vrijednosti ACTB C_T tek unutar kriterija prihvatljivosti; vrijednosti C_T od 25 do 26,4) mogli bi dati lažno negativan rezultat. Preporučuje se jedno ponavljanje testiranja metodom PCR-a. Negativan rezultat ponovljenog testa znači da je uzorak negativan na hipermetilaciju, a pozitivan rezultat znači da je uzorak pozitivan na hipermetilaciju.
- U uzorcima s visokom celularnošću koji se obrađuju primjenom protokola izravne konverzije prisutan je rizik za preopterećenje reakcije PCR-a DNA-om, koje može dovesti do lažno negativnog rezultata za ciljni *FAM19A4*. Stoga se za uzorke s 1) negativnim rezultatom hipermetilacije, 2) vrijednošću ACTB $C_T \leq 23$ i 3) vrijednošću *FAM19A4* $\Delta\Delta C_T$ između 10,36 i 11,36 preporučuje ponavljanje reakcije PCR-a s 5 puta manjim ulaznim volumenom konvertirane DNA razrjeđivanjem uzorka vodom.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i stranicu s najčešćim pitanjima u našem Centru za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Znanstvenici u tehničkoj službi društva QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja možda imate vezano uz informacije i protokole u ovom priručniku ili tehnologije uzorkovanja i ispitivanja (informacije za kontakt potražite na poledini ili posjetite www.qiagen.com).

Za informacije o rješavanju problema u vezi sa softverom Rotor-Gene AssayManager pogledajte *Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Komentari i prijedlozi

Općenito postupanje

Koncentracija uzorka DNA preniska je za bisulfitnu konverziju

Provjerite ekstrakt DNA

Ponovite ekstrakciju DNA s kliničkim uzorkom veće koncentracije

Uzorak ima nevažeći rezultat: amplifikacija ACTB-a je preniska ili ne postoji

a) Pogreška u pipetiranju ili izostavljeni reagensi

Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovite postupak PCR-a.

b) Provjerite koncentraciju DNA

Maksimalno povećajte ulazni volumen DNA za bisulfitnu konverziju. Optimalni učinak reakcije bisulfitne konverzije postiže se s ulaznim volumenom DNA u rasponu od 100 ng do 2 µg

c) Za protokol „Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnom ispitku“ provjerite celularnost kliničkog ispitka

Ponovite reakciju bisulfitne konverzije s 10 % cervikalnog ispitka u mediju za prikupljanje PreservCyt (tj. 2 mL od 20 mL).

d) Provjerite bisulfitno konvertirani eluat

Ponovite bisulfitnu konverziju; po potrebi se može upotrebljavati veći ulazni volumen DNA.

Za uzorak je dobiven nevažeći rezultat: ciljni geni *FAM19A4* i/ili *hsa-mir124-2* nevažeći su

Nedovoljno miješanje

Promiješajte uzorak i reakcijsku mješavinu pipetiranjem (približno 10 puta po epruveti). Ponovno obradite uzorak.

Pozitivna kontrole ima nevažeći rezultat: amplifikacija je preniska ili ne postoji za jedan ili više ciljeva

a) Pogreška u pipetiranju ili izostavljeni reagensi

Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovite postupak PCR-a.

Komentari i prijedlozi

b) Djelomična degradacija	Sadržaj kompleta čuvajte na temperaturi od –30 do –15 °C. Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje do maksimalno tri ciklusa.
c) PCR reagensi djelomično degradirani	Sadržaj kompleta čuvajte na temperaturi od –30 do –15 °C, a reakcijske smjese čuvajte na mjestu zaštićenom od svjetlosti. Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje.
d) Inverzija strip epruvete	Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije.
e) Rok trajanja	Provjerite rok trajanja kompleta koji upotrebljavate.
f) Kašnjenje između pipetiranja uzoraka i početka postupka	Reakcijske mješavine za PCR mogu se čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C u trajanju od 30 minuta u mraku između dispenziranja uzoraka u reakcijske mješavine za PCR i pokretanja postupka na uređaju.

Kontrola bez predloška (no template control, NTC) je nevažna

a) Pogreška u pipetiranju	Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovite postupak PCR-a.
b) Križna kontaminacija	Zamijenite sve kritične reagentse. Uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalom uvijek rukujte u skladu s uobičajeno prihvaćenim praksama kako biste spriječili kontaminaciju uslijed prijenosa.
c) Kontaminacija reagensa	Zamijenite sve kritične reagentse. Uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalom uvijek rukujte u skladu s uobičajeno prihvaćenim praksama kako biste spriječili kontaminaciju uslijed prijenosa.
d) Inverzija strip epruvete	Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije.
e) Kašnjenje između pipetiranja uzoraka i početka postupka	Reakcijske mješavine za PCR mogu se čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C u trajanju od 30 minuta u mraku između dispenziranja uzoraka u reakcijske mješavine za PCR i pokretanja postupka na uređaju.
f) Degradacija probe	Čuvajte reakcijske smjese zaštićene od svjetlosti. Provjerite ima li lažno pozitivnih rezultata na krivulji fluorescencije.

Nema signala u uzorku ili je signal jako slab, ali kontrolni postupak je u redu

a) Inhibitorski učinci	Tijekom bisulfitne konverzije uvijek potvrdite da nema ostataka pufera na filtru nakon centrifugiranja. Ponovite bisulfitnu konverziju.
b) Pogreška u pipetiranju	Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovite postupak PCR-a.

Ako problem i dalje postoji, obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Ograničenja

Reagensi testa QIASure Methylation Test smiju se upotrebljavati isključivo za in vitro dijagnostiku.

Upotreba PCR testova zahtijeva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je usmjerena na molekularnu biologiju i usklađena s primjenjivim propisima i važećim normama.

Reagensi i upute koji su priloženi uz ovaj komplet potvrđeni su za optimalni radni učinak.

QIASure Methylation Test namijenjen je za laboratorijske stručnjake obučene za upotrebu instrumenata Rotor-Gene Q MDx i softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Proizvod je namijenjen da ga upotrebljavaju samo zaposlenici koji su dobili posebne upute i posebno su obučeni za tehnike real-time PCR i in vitro dijagnostičke postupke. Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti zajedno s drugim kliničkim ili laboratorijskim nalazima.

Strogo pridržavanje uputa iz korisničkog priručnika neophodno je za dobivanje optimalnih rezultata PCR-a.

Potrebno je obratiti pozornost na rokove trajanja koji su otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponenti. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok trajanja.

Uzorci s niskom kvalitetom/količinom DNA (tj., vrijednosti ACTB C_T tek unutar kriterija prihvatljivosti; vrijednosti C_T od 25 do 26,4) mogli bi dati lažno negativan rezultat. Preporučuje se jedno ponavljanje testiranja. Negativan rezultat ponovljenog testa znači da je uzorak negativan na hipermetilaciju, a pozitivan rezultat znači da je uzorak pozitivan na hipermetilaciju.

Svi reagensi isporučeni uz test QIASure Methylation Test namijenjeni su za upotrebu s drugim reagensima isporučenima u istome kompletu. U suprotnom bi mogli utjecati na radni učinak.

QIASure Methylation Test validiran je za žene pozitivne na HPV.

QIASure Methylation Test validiran je za cervikalne ispitke prikupljene i pohranjene u medije PreservCyt, SurePath™ ili STM i za vaginalne ispitke koje su pacijentice same prikupile četkicom pohranjene u medij PreservCyt po primitku u laboratorij.

Samo je instrument Rotor-Gene Q MDx validiran za upotrebu s PCR ispitivanjem QIASure Methylation Test.

Svaka upotreba ovog proizvoda koja nije u skladu s njegovom namjenom i/ili modifikacija komponenata poništava odgovornost tvrtke Self-screen B.V.

Odgovornost je korisnika potvrditi radne značajke sustava za sve postupke koji se izvode u laboratoriju, a koje ne pokrivaju ispitivanja radnih značajki koje je provela tvrtka Self-screen.

Radne značajke

Granica detekcije (LOD)

Analitička osjetljivost testa QIASure Methylation Test određena je kao 95 %-tna granica detekcije (95 %-tni LOD) primjenom serijskih razrjeđivanja plazmida koji sadržava tri sekvence amplikona (tj. *ACTB*, *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*; raspon 750.000 do 0,25 kopija po PCR-u). 95 %-tni LOD za ciljeve procijenjen je kao najniže razrjeđivanje plazmida za koje je dobiveno barem 35 od 36 pozitivnih rezultata ($C_T < 40$). Ukupno, četiri različita rukovatelja izvela su 12 eksperimenata (1 postupak po rukovatelju dnevno) primjenom tri različite serije i na tri različita sustava RGQ. Svaki eksperiment uključivao je testiranje 11 razrjeđivanja plazmida u triplikatu. 95 %-tni LOD za sva je tri različita cilja iznosio 7,5 kopija po PCR-u.

Linearnost

Linearnost ispitivanja QIASure određena je s pomoću podataka iz 12 eksperimenata provedenih za procjenu 95 %-tnog LOD-a. Dva cilja, *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* te referentni *ACTB* imaju linearnu amplifikaciju od 750.000 do 7,5 kopija po PCR-u.

Preciznost

Preciznost testa QIASure Methylation Test određena je kao varijabilnost unutar ispitivanja (varijabilnost više rezultata dobivenih za uzorke iste koncentracije unutar jednog eksperimenta) i ukupna varijanca ispitivanja (varijabilnost više rezultata ispitivanja dobivenih obradom različitih rukovatelja, na različitim instrumentima, primjenom različitih serija, u različitim laboratorijima). Testiranje je provedeno na bisulfitno konvertiranoj DNA dobivenoj iz cervikalnog ispitka pozitivnog na HPV visokog rizika za koji je dobiven rezultat pozitivan na hipermetilaciju sa signalima za *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* koji odgovaraju koncentraciji 3 puta većoj od LOD-a. Testiranje je provedeno u duplikatu u 8 postupaka koje su izvodila četiri različita rukovatelja (jedan postupak po rukovatelju dnevno) primjenom dvije različite serije i tri različita uređaja RGQ u dva

različita laboratorija, čime je dobiveno 16 podatkovnih točaka po uzorku. Koeficijent varijacije (coefficient of variation, CV) određen je za vrijednosti C_T i $\Delta\Delta C_T$ (Tablica 3).

Tablica 3. % CV vrijednosti C_T i $\Delta\Delta C_T$ u cervikalnom uzorku pozitivnom na metilaciju

	Vrsta uzorka	Vrsta uzorka (%)	Vrsta uzorka (%)
Vrijednost C_T	Interna kontrola kvalitete uzoraka (tj. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
Vrijednost $\Delta\Delta C_T$	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Ukupni statistički raspon vrijednosti C_T za uzorak s navedenom koncentracijom iznosi 1,32 % za internu kontrolu kvalitete uzoraka (ACTB), 1,52 % za *FAM19A4* i 1,64 % za *hsa-mir124-2*. Ukupni statistički raspon vrijednosti $\Delta\Delta C_T$ za uzorak s navedenom koncentracijom iznosi 5,97 % za *FAM19A4* i 5,75 % za *hsa-mir124-2*.

Interferirajuće tvari

Inhibirajuće tvari odabrane zbog njihovog potencijalnog učinka na PCR su pufer za desulfonaciju i ispiranje u kompletu za bisulfitnu konverziju. Tvari potencijalno prisutne u originalnom uzorku nisu ispitane s obzirom na činjenicu da se uzorak DNA dvaput pročišćava zncima od silika-gela, tj. ekstrakcijom DNA iz originalnog uzorka i pročišćavanjem DNA nakon bisulfitne konverzije. Tragovi pufera za desulfonaciju i ispiranje pokazali su interferenciju u PCR-u, što je otkriveno nevažjećim rezultatom testa za internu kontrolu kvalitete uzoraka.

Kliničke radne značajke

Cervikalni ispitci pozitivni na HPV*

Kliničke radne značajke testa QIASure Methylation Test za cervikalnu intraepitelnu neoplaziju 3. razreda (CIN 3) i cervikalni karcinom (tj. CIN 3+) procijenjene su retrospektivnom studijom u više centara unutar EU-a (13). QIASure Methylation Test procijenjen je za 2384 cervikalna uzorka za probir pozitivna na HPV prikupljena od žena (u dobi od 29 do 76 godina) iz četiriju država EU-a (Škotska, Slovenija, Danska, Nizozemska)(13). Ispitci su prikupljeni u medij PreservCyt ili SurePath. Populacija za ispitivanje obuhvaćala je 2012 žena kod kojih nisu pronađeni dokazi za bolest u okviru 2-godišnjeg praćenja (skraćeno $\leq$ CIN 1), 124 s CIN 2, 228 s CIN 3 i 20 s karcinomom. DNA je ekstrahirana iz cervikalnih uzoraka i 250 ng DNA upotrebljavalo se kao ulazni volumen u reakciji bisulfitne konverzije (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Od 250 ng modificirane DNA, 20 % se upotrebljavalo u PCR-u (što odgovara 50 ng originalne ciljane DNA po PCR-u). Ukupne stope pozitivnosti testa QIASure Methylation Test razvrstane prema kliničkoj krajnjoj točki navedene su u nastavku (Tablica 4).

Tablica 4. Stope pozitivnosti testa QIASure Methylation Test

Klinička krajnja točka	Frakcija	Stopa pozitivnosti (95 %-tni CI)
$\leq$ CIN 1	437/2012	21,7 % (20 – 23,6)
CIN 2	58/124	46,8 % (38,1 – 56,6)
CIN 3	176/228	77,2 % (71,3 – 82,2)
Rak vrata maternice	19/20	95,0 % (70,7 – 99,3)

Među cervikalnim uzorcima pozitivnima na HPV visokog rizika, osjetljivost za CIN 3+ iznosi 78,6 % (195/248; 95 %-tni CI: 73,1 – 88,3) i ukupna specifičnost testa QIASure Methylation Test iznosila je 78,3 % (n = 2013; 95 %-tni CI: 76 – 80). Negativna prediktivna vrijednost ishoda pozitivnih na visokorizični HPV (high-risk HPV, hrHPV) i negativnih na metilaciju iznosila je 99,9 % za rak vrata maternice (N = 1694; 95 %-tni CI: 99,6 – 99,99), 96,9 % za CIN3+ (95 %-tni CI: 96 – 98) i 93,0 % za CIN2+ (95 %-tni CI: 92 – 94).

* Cervikalni ispitci koje je prikupio liječnik.

Dodatno je procijenjena osjetljivost na rak vrata maternice u retrospektivnoj studiji s više centara diljem svijeta na 519 invazivnih karcinoma različitih histotipova iz više od 25 država (11). DNA je ekstrahirana iz cervikalnih uzoraka i 250 ng DNA upotrebljavalo se kao ulazni volumen u reakciji bisulfitne konverzije (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Od 250 ng modificirane DNA, 20 % se upotrebljavalo u PCR-u (što odgovara 50 ng originalne ciljne DNA po PCR-u). 510 od 519 karcinoma dalo je pozitivan rezultat ispitivanja testom QIASure Methylation Test, uz stopu pozitivnosti od 98,3 % (95 %-tni CI: 96,7 – 99,2), stope pozitivnosti razvrstane prema histotipu navedene su u nastavku, u Tablica 5. Stopa pozitivnosti testa QIASure Methylation Test u ispiscima raka vrata maternice.

Tablica 5. Stopa pozitivnosti testa QIASure Methylation Test u ispiscima raka vrata maternice

Klinička krajnja točka	Frakcija	Stopa pozitivnosti (95 %-tni CI)
Karcinom pločastih stanica	313/318	98,4 % (96,4 – 99,5)
Adenokarcinom	121/123	98,4 % (94,2 – 99,8)
Adenoskvamozni karcinom	42/42	100,0 % (91,6 – 100)
Rijetki histotipovi karcinoma	30/32	93,8 % (79,2 – 99,2)
Neutvrđeni histotip karcinoma	4/4	100 % (39,8 – 100,0)

Vaginalni ispiti koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice pozitivni na HPV

Kliničke radne značajke testa detekcije cervikalne intraepitelne neoplazije razreda 3 i cervikalnog karcinoma (tj. CIN 3+) testom QIASure Methylation Test za vaginalne ispitke koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice, procijenjene su testiranjem 247 vaginalnih ispitaka pozitivnih na HPV visokog rizika. Za 14 uzoraka (5,7 %) dobivene vrijednosti ACTB C_T iznosile su > 26,4 i u skladu s time rezultat je bio nevažeci. Od uzoraka s važećim rezultatima testa, 148 su sačinjavali uzorci koje su žene same prikupile s pomoću četkice s ≤CIN 1 nakon 18 mjeseci kontrole, 24 uzorci s CIN 2, 50 s CIN 3, 8 s karcinomom pločastih stanica i 3 s adenokarcinomom. DNA je ekstrahirana iz vaginalnih ispitaka i 250 ng DNA upotrebljavalo se kao ulazni volumen u reakciji bisulfitne konverzije (EZ DNA methylation kit, ZYMO Research). Od 250 ng bisulfitno konvertirane DNA, 20 % se upotrebljavalo u PCR-u (što odgovara 50 ng originalne ciljne DNA po PCR-u). Stope pozitivnosti testa QIASure Methylation Test razvrstane prema kliničkoj krajnjoj točki navedene su u nastavku (Tablica 6.).

Tablica 6. Stope pozitivnosti testa QIASure Methylation Test u vaginalnim ispiscima koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice

Klinička krajnja točka	Frakcija	Stopa pozitivnosti (95 %-tni 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 pločastih stanica	8/8	100,0 % (63,1 – 100,0)
Adenokarcinom	3/3	100,0 % (29,2 – 100,0)

Među vaginalnim ispiscima koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice pozitivnima na HPV visokog rizika, osjetljivost za CIN 3+ iznosi 72,1 % (44/61; 95 %-tni CI: 59,7-81,9), a za karcinom iznosi 100 % (11/11; 95 %-tni CI: 72–100).*

Radni učinak *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* za detekciju transformirajućih CIN lezija u uznapredovaloj fazi

Analiza metilacije promotora stanice domaćina specifično otkriva „uznapredovali“ stupanj takozvanih CIN lezija koje imaju profil metilacije sličan karcinomu i imaju očekivani visoki kratkoročni rizik od prelaska u karcinom (7, 8). Radni učinak analize hipermetilacije promotora gena *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* procijenjena je testiranjem 29 ispitaka pozitivnih na HPV visokog rizika žena s transformirajućim CIN 2/3 u uznapredovaloj fazi i 19 ispitaka pozitivnih na HPV visokog rizika žena s transformirajućim CIN 2/3 u ranoj fazi. Metilacija je osobito povezana s uznapredovalim stanjem bolesti, uz pozitivan rezultat hipermetilacije za sve uznapredovale CIN2/3 lezije (100 %; 29/29; 95 %-tni CI: 88–100) u usporedbi s 47 % (9/19; 95 %-tni CI: 27–69) za CIN 2/3 lezije u ranoj fazi.

* **Napomena:** Hipermetilacija ciljnih gena u uzorcima žena koje imaju uznapredovale CIN lezije i/ili cervikalni karcinom može ostati neotkrivena zbog varijabilnosti uzorkovanja, npr. kao rezultat neodgovarajućeg uzorkovanja.

Otpornost

Otpornost testa QIASure Methylation Test određena je kao podudaranje rezultata testa QIASure Methylation Test i rezultata dobivenih verzijom ispitivanja samo za upotrebu u istraživanju (Research Use Only, RUO). Testiranje je provedeno na bisulfitno konvertiranoj genomskoj DNA dobivenoj iz 10 cervikalnih uzoraka pozitivnih na HPV visokog rizika, od kojih je za 5 prethodno utvrđeno da su negativni na hipermetilaciju za oba markera, a za 5 je utvrđeno da su pozitivni na metilaciju (npr. za barem jedan od 2 markera). Testiranje je provedeno u duplikatu u 8 postupaka koje su izvodila četiri različita rukovatelja (jedan postupak po rukovatelju dnevno) primjenom dviju različitih serija i triju različitih instrumenata Rotor-Gene Q MDx u dvama različitim laboratorijima. Ukupno je dobiveno 16 podatkovnih točaka za svaki uzorak (Tablica 7).

Tablica 7. Podudaranje testa QIASure Methylation Test i RUO verzije ispitivanja

Broj uzorka	RUO rezultat	Podudaranje s RUO u laboratoriju 1	Podudaranje s RUO u laboratoriju 2
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)
Međuzbroj		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)
Međuzbroj		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Četiri od pet uzoraka za koje je prethodno utvrđeno da su negativni na metilaciju pokazali su 100 % podudaranja primjenom testa QIASure Methylation Test u oba laboratorija. Uzorak 3 pokazao je podudaranje od 62,5 % (5/8) u oba laboratorija. Uočena varijacija bila je povezana s *FAM19A4* u razinama blizu granične vrijednosti ispitivanja. Ukupno podudaranje za uzorke negativne na metilaciju iznosilo je 92,5 % (37/40).

Svih 5 uzoraka za koje je prethodno utvrđeno da su pozitivni na metilaciju pokazalo je 100 % podudaranja s referentnim ispitivanjem, stoga je ukupno podudaranje iznosilo 100 % (40/40).

Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnim ispitcima

Protokol „Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnim ispitcima s pomoću kompleta EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit” provjeren je usporedbom s referentnim protokolom (tj. bisulfitna konverzija s prethodnom kontrolom količine uzorka DNA) na 119 cervikalnih brisova, nakon čega je proveden test QIASure Methylation Test. Stopa uspješnosti za bisulfitnu konverziju izravno na cervikalnim uzorcima primjenom 2,5 % ulaznog volumena cervikalnog ispitka iznosila je 95,8 % (114/119) i povećala se na 100 % nakon ponovnog testiranja nevažjećih rezultata s ulaznim volumenom cervikalnog ispitka od 10 %. Podudaranje rezultata testa QIASure Methylation Test između više protokola bisulfitne konverzije iznosilo je 90,8 % (108/119; kappa vrijednost 0,75).

Protokol „Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnim ispitcima s pomoću kompleta QIASymphony Bisulfite Kit” provjeren je usporedbom s referentnim protokolom (tj. bisulfitna konverzija s prethodnom kontrolom količine uzorka DNA) na 120 cervikalnih brisova, nakon čega je proveden test QIASure Methylation Test. Stopa uspješnosti za bisulfitnu konverziju izravno na cervikalnim uzorcima primjenom 2,5 % ulaznog volumena cervikalnog ispitka iznosila je 94,2 % (113/120) u usporedbi s 97,5 % (117/120) uz primjenu referentnog protokola. Podudaranje rezultata testa QIASure Methylation Test između više protokola bisulfitne konverzije iznosilo je 94,7 % (107/113; kapa vrijednost 0,88).

Referencije

1. Costello, J.F., and Plass, C. (2001) Methylation matters. *J. Med. Genet.* 38, 285–303.
2. Wilting, S.M., et al. (2010) Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-mir124 in cervical cancer. *Mol. Cancer* 9, 167.
3. De Strooper, L.M., et al., (2014) Methylation analysis of the FAM19A4 gene in cervical scrapes is highly efficient in detecting cervical carcinomas and advanced CIN2/3 lesions. *Cancer Prev. Res.* 7, 1251–7.
4. De Strooper, L.M., et al. (2014) CADM1, MAL and mir124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J. Clin. Pathol.* 67, 1067–71.
5. De Strooper, L.M., et al. (2016) Comparing the performance of FAM19A4 methylation analysis, cytology and HPV 16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in high-risk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). *Int. J. Cancer* 138, 992–1002.
6. De Strooper, L.M., et al. (2016) Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol. Oncol.* 141, 341–7.
7. Bierkens, M. et al. (2013) CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int. J. Cancer* 133, 1293–9.
8. Steenbergen, R.D.M. et al. (2014) Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* 14, 395–405.
9. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8.
10. De Strooper, L.M., et al. (2018) Cervical cancer risk in HPV-positive women after a negative FAM19A4/miR124-2 methylation test: A post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow-up. *Int. J. Cancer* 143, 1541–1548.

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

Simboli

Na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
	Upotrijebiti do
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Simbol s oznakom CE-IVD
	Sadržava reagensa dovoljno za <N> reakcija
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala
	Komponente
	Sadržava
	Broj
	R se odnosi na reviziju uputa za uporabu (priručnika), a n je broj revizije
	Globalni broj trgovačke jedinice
	Ograničenje temperature
	Proizvođač
	Zaštitite od svjetlosti



Pogledajte upute za uporabu



Oprez

Kontaktni podaci

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku pomoć na www.qiagen.com/Support, nazovite broj 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili svojim lokalnim distributerima (pogledajte poledinu ili posjetite stranicu www.qiagen.com).

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QIASure Methylation Test Kit	Za 72 reakcije: 2 glavne mješavine, 2 kalibratora.	616014
QIAasymphony SP	Modul QIAasymphony za pripremu uzoraka; uključuje 1-godišnje jamstvo na dijelove i rad (opcionalno za automatiziranu ekstrakciju)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cikler za real-time PCR i analizator za mekšanje visoke razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, dodatni pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo za dijelove i rad, ugradnju i obuku	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cikler za real-time PCR i analizator za mekšanje visoke razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, dodatni pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo za dijelove i rad, ugradnja i obuka nisu uključeni	9002032

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Dodatni pribor za instrument Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcije s jednokanalnom pipetom sa 72 epruvete od 0,1 mL	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 stripova od 4 epruvete i čepa za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1mL (2500)	10 x 250 stripova od 4 epruvete i čepa za 10.000 reakcija	981106
Rotor-Gene AssayManager – za rutinsko testiranje na instrumentima Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene AssayManager	Softver za rutinsko testiranje u kombinaciji s instrumentima Rotor-Gene Q i QIA Symphony RGQ; softver s jednom licencijom za instalaciju na jedno računalo	9022739

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju od odgovornosti specifične za proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku za QIAGEN komplet ili korisničkom priručniku. Priručnici za komplete i korisnički priručnici tvrtke QIAGEN dostupni su na web-mjestu www.qiagen.com ili ih možete zatražiti od tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom.

Povijest revizija dokumenta

Datum	Izmjene
R4, lipanj 2019.	Revidirani grafikon tijekom rada u Načelo i postupak; dodan EpiTest Fast 96 Bisulfite Kit u Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni; revidirani sadržaj okvira Sigurnosne informacije; dodane informacije o postupku zagrijavanja za RGQ MDx 5-plex HRM; revidirani odjeljak Priprema uzorka; dodana dodatna stavka za rješavanje problema; dodana tema Bisulfitna konverzija izravno na cervikalnom ispitku u Radne značajke; ažurirani odjeljak Referencije; ažuriranja rasporeda
R5, srpanj 2023.	Dodani instrumenti QIAsymphony za opcionalnu automatizaciju ekstrakcije i komplet QIAsymphony Bisulfite u odjeljku Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni; revidiran odjeljak Priprema uzorka; dodana uporaba medija za prikupljanje SurePath; revidiran odjeljak Kliničke radne značajke. Dodani naslovi za tablicu 5 i tablicu 6.

Ugovor o ograničenoj licenci za QIAure Methylation Test

Upotrebom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

- Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu www.qiagen.com. Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krši prava trećih strana.
- Osim izričito navedenih licencija, tvrtka QIAGEN ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
- Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, preradivati niti preprodavati.
- QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
- Kupac i korisnik kompleta potvrđuju da neće poduzeti niti dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja navedenih odredbi ili olakšati njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenci na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenci ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na www.qiagen.com.

Tvrtka Self-screen B.V. zakonski je proizvođač testa QIAure Methylation Test.

QIAure Methylation Test proizvodi tvrtke Self-screen B.V. i u Europi ga distribuira tvrtka QIAGEN.

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony®, *digene*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); BD®, SurePath® (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyt® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.). Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

07-2023 HB-2304-005 1132288 © 2023 QIAGEN, sva prava pridržana.

Narudžbe www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com | Web-mjesto www.qiagen.com