

Juli 2023

QIASure™ Methylation Test

Bruksanvisning (håndbok)



Versjon 1

Til bruk sammen med Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM-instrument



616014

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

1132288NB

Innhold

Tiltent bruk	4
Sammendrag og forklaring	5
Prosedyreprinsipp	5
Materialer som medfølger	7
Kitets innhold	7
Materialer som er nødvendige, men ikke følger med	7
Advarsler og forholdsregler	10
Sikkerhetsinformasjon	10
Generelle forholdsregler	10
AssayManager-profilforholdsregler	12
Oppbevaring og håndtering av reagenser	13
Håndtering og oppbevaring av prøver	14
Prøveklargjøring for prøver oppbevart i PreservCyt	16
Prøveklargjøring for prøver oppbevart i SurePath™	19
Generelle anbefalinger for bisulfittkonvertering	20
Protokoll: QIASure Methylation Test PCR i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	21
Tolkning av resultater	32
Feilsøkningsveiledning	36
Begrensninger	38
Ytelsesegenskaper	40
Deteksjonsgrense (LOD)	40
Linearitet	40

Presisjon	40
Interfererende stoffer	41
Klinisk ytelse	42
Robusthet.....	44
Referanser	47
Symboler	49
Kontaktinformasjon	50
Bestillingsinformasjon	51
Endringshistorikk for dokument	54

Tiltenkt bruk

QIASure Methylation Test (kat.nr. 616014) er en multipleks metyleringsspesifikk real-time PCR-analyse for detektering av promoterhypermetylering av genene *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*. Prøver som kan testes med QIASure Methylation Test, omfatter bisulfitkonvertert DNA isolert fra prøver tatt på følgende måter:

- Livmorhalsprøver tatt med *digene*® HC2 DNA Collection Device (tatt av lege)
- Livmorhalsprøver tatt ved hjelp av en prøvetakingsenhet av børstetypen og plassert i PreservCyt® Solution eller SurePath™ Solution (tatt av lege)
- Vaginale prøver tatt ved hjelp av en prøvetakingsenhet av børstetypen (tatt av pasient)

Indikasjoner for bruk:

1. Som en oppfølgingstest for kvinner med positiv test for humant papillomvirus (HPV) for å bestemme behovet for henvisning til kolposkopi eller andre oppfølgingsprosedyrer.
2. Som en oppfølgingstest for kvinner med resultater fra celleprøver med atypiske plateepiteler av ubestemt betydning (ASC-US) for å bestemme behovet for henvisning til kolposkopi eller andre oppfølgingsprosedyrer.

Dette produktet skal brukes av fagpersoner, for eksempel teknikere og laboratorieteknikere som har fått opplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer, molekylærbiologiske teknikker og Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-systemet.

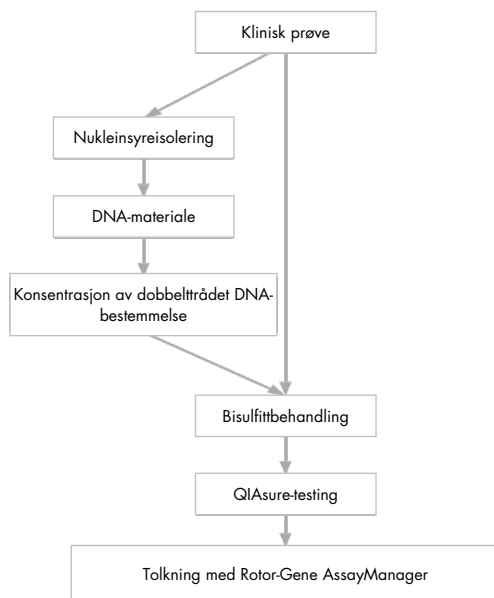
Sammendrag og forklaring

DNA-metylering er en biokjemisk prosess som er viktig for normal utvikling hos høyerestående organismer (1). Det involverer tilsetning av en metylgruppe i den 5. posisjonen i cytosinnukleotidets pyrimidinring. Unormale mønstre av DNA-metylering spiller også en viktig rolle i karsinogenese. Ved flere humane krefttyper og kreftcellelinjer, deriblant kreft i livmorhals og endometrium, er det detektert promoterhypermetylering av genene *FAM19A4* (familie med sekvenslikhet 19 (kjemokin (C-C-motiv)-lignende) medlem A4) og/eller *hsa-mir124-2* (*homo sapiens mikro-RNA 124-2*) (2–6). Analyse av promotermetyletering hos vertsceller detekterer nærmere bestemt kreft og såkalt "fremskredne" lesjoner etter cervical intraepitelial neoplasia (CIN), som har en kreftlignende metyleringsprofil og en stor kortsiktig risiko for å utvikle seg til kreft (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). QIASure-analysen gjør det mulig å detektere promoterhypermetylering av genene *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* på bisulfittkonvertert DNA isolert fra livmorhals- eller vaginalprøver ved hjelp av ACTB (humant β -aktin-gen) som intern kvalitetskontroll for prøvene.

Prosedyreprinsipp

QIASure Methylation Test er en metyleringsspesifikk multipleks real-time PCR-analyse som amplifiserer de metylerte promoterregionene i tumorsuppressorgenene *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*, så vel som et metyleringsuspesifikt fragment av et referansegene. Settet består av 2 rør med QIASure Master Mix og 2 rør med QIASure Calibrator. Masterblandingen brukes til amplifikasjon av bisulfittkonvertert DNA klargjort fra kliniske prøver. Masterblandingen inneholder primerne og probene for målgenene og referansegene, som fungerer som intern kvalitetskontroll for prøvene. Kalibratoren er et linearisert plasmid som inneholder sekvenser av *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* og ACTB-amplikoner.

Arbeidsflytprosedyre



QIASure-analysen utføres på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og Rotor-Gene AssayManager®-programvaren utfører automatisk dataanalyse og tolkning. C_T -verdien (syklusterskelen) representerer antallet PCR-sykluser som er nødvendige for å detektere et fluorescenssignal over et bakgrunnssignal, noe som har sammenheng med antallet mål molekyler i prøven. QIASure-analysen beregner ΔC_T -verdien som forskjellen mellom C_T -verdien av *FAM19A4* eller *hsa-mir124-2*-målne og C_T -verdien av referansen (ACTB). Denne ΔC_T -verdien er en relativ kvantitativ verdi for promotermetyleringsnivået i *FAM19A4* eller *hsa-mir124-2*-genet. For normalisering trekkes ΔC_T -verdien for en kalibratorprøve fra ΔC_T -verdien for *FAM19A4* eller *hsa-mir124-2*-målne, noe som gir en $\Delta\Delta C_T$ -verdi (9). Kalibratoren er en standardisert lavkopiplasmid-DNA-prøve med kjent kopitall for de tre målne (dvs. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* og ACTB).

Materialer som medfølger

Kitets innhold

QIASure Methylation Test		72
Katalognr.		616014
Antall reaksjoner		72
QIASure Master Mix (2 rør)	Rør med brun farge	630 µl
QIASure Calibrator (2 rør)	Rør med gjennomsiktig farge	25 µl
Bruksanvisning (håndbok) for QIASure Methylation Test		1

Materialer som er nødvendige, men ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller under arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

Forbruksartikler og reagenser for prøveklargjøring for prøver tatt av pasient

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Reagenser for klargjøring av prøver lagret i SurePath-prøvetakingsmedium.

- Buffer AL (QIAGEN-katalognummer: 19075)

Forbruksmaterialer og reagenser for bisulfitkonvertering

Kontrollerte bisulfitkonverteringssett omfatter:

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

Forbruksartikler for Rotor-Gene Q MDx-instrumentet

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (remserør og lokk, 0,1 ml; kat.nr. 981103)
- Renset vann (f.eks. molekylærbiologisk grad, destillert eller deionisert)

Utstyr

- Justerbare pipetter* beregnet på PCR (1–10 µl, 10–100 µl)
- Engangshansker
- Bordsentrifuge* med en hastighet > 10 000 o/min
- Vorteksmikser*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, kat.nr. ND-3300) eller tilsvarende
- QIASymphony SP System (kat.nr. 9001297) for valgfri automatisert ekstraksjon og/eller bisulfitkonvertering

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

Utstyr for real-time PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-system (kat.nr. 9002033) eller Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument (kat.nr. 9002032)*
- Rotor-Gene AssayManager Core Application-programvare versjon 1.0.x (der x er større enn eller lik 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in installert, versjon 1.0.x (der x er større enn eller lik 1)
- QIASure Assay Profile (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (der Y er større enn eller lik 1) til bruk på bisulfittkonvertert DNA fra livmorhalsprøver tatt av lege
- QIASure-analyseprofilen for børsteprøve tatt av pasient (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (der Y er større enn eller lik 0) til bruk på bisulfittkonvertert DNA fra vaginale børsteprøver tatt av pasient

* Hvis aktuelt, Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter som er produsert i januar 2010 eller senere. Serienummeret på baksiden av instrumentet inneholder produksjonsdatoen. Serienummeret er i formatet "mmåånn" der "mm" angir produksjonsmåned i tall, "åå" angir de siste to tallene i produksjonsåret, og "nn" angir den unike instrumentID-en.

Advarsler og forholdsregler

Kun til bruk i in vitro-diagnostikk.

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller under arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige elektronisk i et lettvinnt og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety der du kan finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatablader for hvert QIAGEN®-sett og hver settkomponent.

QIASURE MASTER MIX



Inneholder: 1,2,4-triazol: Fare! Antatt å skade forplantningsevnen eller gi fosterskader. Bruk vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

Generelle forholdsregler

Bruk av PCR-tester krever god laboratoriepraksis, inkludert vedlikehold av utstyr som er dedikert til molekylærbiologi og i samsvar med gjeldende regelverk og relevante standarder.

Vær alltid oppmerksom på følgende punkter:

- Bruk puddefrie engangshansker, laboratoriefrakk og øyevern ved håndtering av prøver.
- Unngå mikrobe- og nuklease (DNase)-kontaminering av prøven og settet. DNase kan forårsake forringelse av DNA-templatet.

- Unngå DNA- eller PCR-produktmedrivingskontaminering som kan føre til et falskt positivt signal.
- Bruk alltid DNase-frie pipettespisser til engangsbruk med aerosolbarriere.
- Reagenser for QIASure-analyse fortynnes optimalt. Fortynn ikke reagensene mer, siden dette kan føre til tap av ytelse.
- Alle reagensene som leveres med QIASure-settet, er utelukkende beregnet for bruk sammen med de andre reagensene i det samme settet. Ikke erstatt ett reagens fra ett sett med samme reagens fra et annet QIASure-sett, ikke engang fra samme batch, ettersom dette kan påvirke ytelsen.
- Se brukerhåndboken for Rotor-Gene Q MDx-instrumentet for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.
- Før dagens første kjøring skal det utføres en oppvarmingskjøring for Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM ved 95 °C i 10 minutter.
- Endring av inkubasjonstider og temperaturer kan føre til feilaktige eller uforenlige data.
- Ikke bruk komponenter i settet som har gått ut på dato, eller som ikke er oppbevart riktig.
- Minimer komponentenes lyseksposering: Reaksjonsblandinger kan bli forandret på grunn av lyseksposering.
- Det er svært viktig å forhindre at blandingen kontamineres med de syntetiske materialene i PCR-reagensene.
- Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

AssayManager-profilforholdsregler

Det kreves forskjellige AssayManager-profiler for forskjellige prøvetyper. Påse at riktig profil brukes for prøvetypen som skal testes, som angitt nedenfor:

- QIASure-analyseprofilen for livmorhalsskrapinger (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) skal brukes til testing av bisulfittkonvertert DNA fra livmorhalsprøver tatt av lege
- QIASure-analyseprofilen for børsteprøver tatt av pasient (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) skal brukes til testing av bisulfittkonvertert DNA fra vaginale børsteprøver tatt av pasient

Oppbevaring og håndtering av reagenser

Forsendelsesvilkår

QIASure Methylation Test sendes på tørris. Hvis en komponent i QIASure Methylation Test ikke er frosset ved ankomst, hvis ytteremballasjen har blitt åpnet under frakt, eller hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkseddel, brukerhåndbok eller reagenser, må du kontakte QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren (se bak på omslaget eller gå inn på www.qiagen.com).

Oppbevaringsforhold

QIASure Methylation Test må umiddelbart etter mottak settes til oppbevaring ved -30 til -15 °C i en mørk fryser med konstant temperatur.

Stabilitet

Når QIASure Methylation Test oppbevares under de spesifiserte oppbevaringsbetingelsene, er settet stabilt frem til utløpsdatoen angitt på esken.

Når reagenser først er åpnet, kan de oppbevares i originalemballasje ved -30 til -15 °C. Gjentatt tining og frysing bør unngås. Maks 3 fryse-tine-sykluser kan benyttes.

- Bland forsiktig ved å vende røret 10 ganger, og sentrifuger alle rørene før åpning.
- Utløpsdatoer for hvert reagens er angitt på de enkelte komponentenes etiketter. Under korrekte oppbevaringsforhold vil produktet opprettholde ytelsen i stabilitetstiden så lenge man bruker de samme partiene med komponenter.

Håndtering og oppbevaring av prøver

FORSIKTIG



Alle prøver må behandles som potensielt smittefarlig materiale.

Livmorhalsprøver

QIAure-settet skal brukes sammen med bisulfittkonverterte genomiske DNA-prøver fra livmorhalsprøver. Godkjente prøvetakingsmedier for livmorhalsprøver (skrapinger) er PreservCyt®-prøvetakingsmedium, SurePath™-prøvetakingsmedium og *Digene* Specimen Transport Medium (prøvetransportmedium, STM). Optimal oppbevaringstemperatur for de kliniske prøvene er 2–8 °C ved ankomst til laboratoriet. Under disse oppbevaringsbetingelsene er prøver i PreservCyt- eller SurePath™-prøvetakingsmedium stabile i 3 måneder før DNA-ekstraksjon.

Merk: Livmorhalsprøver i STM kan sendes ved 2–30 °C for levering neste dag til testlaboratoriet, og fryses på nytt ved –20 °C ved mottak.

Vaginale børsteprøver tatt av pasient

QIAure Methylation Test skal brukes sammen med bisulfittkonverterte genomiske DNA-prøver ekstrahert fra vaginale børsteprøver tatt av pasient. Vaginale børsteprøver tatt av pasient kan tas og sendes tørre, og ved ankomst til laboratoriet kan de oppbevares i PreservCyt-prøvetakingsmedium med et anbefalt oppbevaringsvolum på 2–3 ml. Prøver i PreservCyt-prøvetakingsmedium kan oppbevares ved 2–8 °C eller romtemperatur i høyst 3 måneder.

Genomisk DNA-prøver

Så snart genomisk DNA er ekstrahert, kan DNA-prøver oppbevares og sendes ved -30 til -15 °C i opptil 12 måneder.

Prøveklargjøring for prøver oppbevart i PreservCyt

QIASure Methylation Test er validert for bruk med bisulfittkonvertert genomisk DNA avledet fra livmorhalsprøver. Bisulfittkonvertering av genomisk DNA kan utføres:

- i) med forutgående prøve-DNA-ekstraksjon og DNA-kvalitetskontroll, eller
- ii) direkte på livmorhalsprøven ved hjelp av EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat.nr. 59720) eller
- iii) direkte på livmorhalsprøven ved hjelp av QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN kat.nr. 931106).

Vår anbefaling er beskrevet nedenfor.

- i) Bisulfittkonvertering med forutgående DNA-ekstraksjon og DNA-kvalitetskontroll
Denne protokollen krever DNA-ekstraksjon, DNA-konsentrasjonsmåling, etterfulgt av alikvotering av optimalt eluatvolum før bisulfittkonverteringsprotokollen startes, og er kontrollert for EZ DNA Methylation™ Kit (kat.nr. D5001) og EZ DNA Methylation-Lightning Kit (kat.nr. D5030) fra ZYMO Research. Vi anbefaler følgende metoder:
 - DNA-ekstraksjon
Standard DNA-ekstraksjonssett (f.eks. kolonnebaserte og magnetkulebaserte sett) er compatible med QIASure Methylation Test.
 - DNA-konsentrasjonsmåling
Før bisulfittkonvertering av DNA må DNA-konsentrasjon måles. Egnede systemer for måling av DNA-konsentrasjonene er Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (begge fra Thermo Fisher Scientific) eller tilsvarende.
 - Alikvotering av DNA-eluat
Optimal DNA-tilførsel for bisulfittkonvertering er fra 100 ng til 2 µg, med 200 ng anbefalt for bisulfittkonverteringen. Hvis DNA-konsentrasjonen er for lav for

bisulfittkonvertering, må DNA-ekstraksjonen gjentas med et høyere tilførselsvolum av den kliniske prøven eller DNA-et elueres i et mindre elusjonsvolum.

- Bisulfittkonvertering med EZ DNA Methylation Kit og EZ DNA Methylation-Lightning Kit utføres ifølge produsentens anbefaling.

Merk: Ifølge EZ DNA Methylation Kit bør ikke maksimal mengde av prøve-DNA overstige 2 µg for å oppnå en tilstrekkelig høy konverteringseffektivitet (> 98 %).

- ii) Bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøve med EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit
Bisulfittkonvertering direkte utført på livmorhalsprøven samlet inn i PreservCyt® Solution er kontrollert for EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit fra QIAGEN. Vi viser til *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion-håndboken* for høykonsentrasjons-DNA-prøver (1 ng – 2 µg) ifølge produsentens anbefaling, unntatt for følgende elementer:
 - Trinn 1 i protokollen. Ta 2,5 % av livmorhalsprøven i PreservCyt®-prøvetakingsmedium (dvs. 500 µl fra 20 ml) og pellet ved sentrifugering i 10 minutter ved minst 3390 x g. Forkast supernatanten og etterlat cellepelletten ved høyst 20 µl PreservCyt-prøvetakingsmedium. Bruk denne cellepelletten og fortsett med trinn 2 i produsentens protokoll for bisulfittkonverteringsreaksjonen.
 - Buffer BL: Ikke tilsett bærer-RNA.
 - Elusjonsvolum av bisulfittkonverterings-DNA-et er 50 µl av Buffer EB for hver prøve.
- iii) Bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøven med QIAsymphony Bisulfite Kit
Bisulfittkonvertering direkte utført på livmorhalsprøven samlet inn i PreservCyt® Solution er kontrollert for QIAsymphony Bisulfite Kit fra QIAGEN. Se håndboken for QIAsymphony Bisulfite Kit. Testingen utføres i henhold til produsentens anbefalinger.
 - Ta 2,5 % av livmorhalsprøven i PreservCyt®-prøvetakingsmedium (dvs. 500 µl fra 20 ml) og pellet ved sentrifugering i 10 minutter ved minst 3390 x g. Forkast supernatanten og etterlat cellepelletten ved høyst 20 µl resterende PreservCyt-prøvetakingsmedium.

- For bisulfittkonverteringsreaksjonen følger du "QIAsymphony SP protokollark – Bisulfite 140_HC_V" fra og med trinn 2. Bruk cellepelleten i stedet for DNA.
- Når bisulfittkonverteringsreaksjonen er fullført, starter du en SP-kjøring på QIAsymphony ved å følge trinnene som er beskrevet i protokollen "Bisulfittkonvertering av umetylerte cytosiner i ulike prøvetyper" i håndboken for QIAsymphony Bisulfite Kit. Elusjon gjøres i 40 µl.

Prøveklargjøring for prøver oppbevart i SurePath™

Prøver som oppbevares i SurePath, må forbehandles før DNA-ekstraksjon. QIASure Methylation Test er validert for bruk med bisulfittkonvertert genomisk DNA avledet fra livmorhalsprøver ifølge prosedyren beskrevet nedenfor.

- Ta 2,5 % av livmorhalsprøven
- Sentrifuger i 10 minutter ved 4000 g, fjern supernatanten, men la 100 µl SurePath™ være igjen
- Tilsett 100 µl buffer AL og resuspender pelleten
- Bland godt og inkluber i 20 minutter ved 90 °C
- Avkjøl i 5 minutter i romtemperatur.
- Utfør DNA-ekstraksjon med QIAamp DNA Mini Kit (eller tilsvarende) i henhold til produsentens instruksjoner, og eluer DNA i 50 µl.
- Mål DNA-konsentrasjon – egnede systemer er Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (begge fra Thermo Fisher Scientific) eller tilsvarende.
- 200 ng DNA anbefales for bisulfittkonvertering. Hvis 200 ng ikke er tilgjengelig, brukes det maksimale inngangsvolumet. Utfør konverteringen med EZ DNA Methylation Kit eller EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo) i henhold til produsentens instruksjoner. 2,5 µl eluat brukes til QIASure Methylation Test.

Generelle anbefalinger for bisulfittkonvertering

Bisulfittkonverteringsreaksjonen bør utføres i et eget område atskilt fra stedet der QIASure Master Mix oppbevares og overføres, slik at kontaminering av reagensene unngås.

Tilførselen i QIASure-reaksjonen er 2,5 µl bisulfittkonvertert DNA.

Hvis den interne kvalitetskontrollen for prøven er negativ (dvs. ACTB C_T-verdiene er > 26,4), medførte prøvens bisulfittkonverterte DNA-preparat materiale av utilstrekkelig mengde og/eller kvalitet og scores som ugyldig. Utfør de anbefalte trinnene for å oppnå en ACTB C_T-verdi som er innenfor det gyldige området for følgende:

- Bisulfittkonvertering med forutgående DNA-ekstraksjon og DNA-mengdekontroll: Gjenta bisulfittkonverteringsreaksjonen med en høyere tilførsel av prøve-DNA og/eller gjenta DNA-isolering med en høyere tilførsel av livmorhalsprøve
- Bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøve: Gjenta bisulfittkonverteringsreaksjonen med 10 %* av livmorhalsprøven i PreservCyt-prøvetakingsmedium (dvs. 2 ml fra 20 ml).

Bisulfittkonvertert DNA kan oppbevares i opptil 24 timer ved 2–8 °C, i opptil 5 dager ved –25 til –15 °C og i opptil 3 måneder ved under –70 °C. Gjentatt frysing/tining av det bisulfittkonverterte DNA-et bør unngås til enhver tid. Antallet fryse/tine-sykluser bør ikke overstige tre, slik at tilstrekkelig kvalitet opprettholdes.

* Prøvevolum for direkte bisulfittkonvertering kan økes når suksessprosenten ikke er tilfredsstillende på grunn av prøvetakingsvariabilitet, for eksempel som følge av ikke tilfredsstillende prøvetaking.

Protokoll: QIASure Methylation Test PCR i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet*

Viktige punkter før du starter

- Ta deg god tid til å bli kjent med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet før du starter protokollen. Se instrumentets (kat.nr. 9002033 eller 9002032) brukerhåndbok.
- Før dagens første kjøring skal det utføres en oppvarmingskjøring for Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM ved 95 °C i 10 minutter.
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 muliggjør automatisert tolkning av PCR-resultatene. QIASure-settet må kjøres på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet ved hjelp av Rotor-Gene AssayManager v1.0. Sett av tid til å bli kjent med Rotor-Gene AssayManager v1.0 (kat.nr. 9022739) og Epsilon Plug-In, og se brukerhåndbøkene for begge.
- Forskjellige Rotor-Gene AssayManager v1.0-analyseprofiler for forskjellige prøvetyper er nødvendig. Påse at riktig profil brukes for prøvetypen som skal testes, som angitt nedenfor:
 - QIASure-analyseprofilen for livmorhalsskrapinger (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) skal brukes til testing av bisulfittkonvertert DNA fra livmorhalsprøver tatt av lege
 - QIASure-analyseprofilen for børsteprøver tatt av pasient (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) skal brukes til testing av bisulfittkonvertert DNA fra vaginale børsteprøver tatt av pasient

* Hvis aktuelt, Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter som er produsert i januar 2010 eller senere. Serienummeret på baksiden av instrumentet inneholder produksjonsdatoen. Serienummeret er i formatet "mmåånnnn" der "mm" angir produksjonsmåneden i tall, "åå" angir de siste to tallene i produksjonsåret og "nnn" angir den unike instrumentID-en.

Merk: Bare én prøvetype per forsøk kan testes. De enkelte analyseprofilene er optimalisert for hver prøvetype, og det er avgjørende for kunder å velge riktig analyseprofil for å oppnå optimale resultater for hver spesifikk prøvetype.

Ting du må gjøre før du starter

- Rotor-Gene AssayManager programvareversjon v1.0.x (der x er større enn eller lik 4) må være installert på datamaskinen koblet til Rotor-Gene Q MDx. For detaljert informasjon om installeringen av kjerneprogramvaren Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application, se *Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application User Manual* (brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager v1.0 kjerneapplikasjon).
- QIASure Methylation Test krever en spesifikk plugin-modul kalt "Epsilon Plug-in" (versjon 1.0.1 eller nyere). Denne plugin-modulen kan lastes ned fra QIAGENs nettside: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Denne plugin-modulen må installeres på en datamaskin som allerede har Rotor-Gene AssayManager versjon 1.0.x (der x er større enn eller lik 4) installert.
- QIASure Methylation Test krever en analysespesifikk profil for å kjøre med Rotor-Gene AssayManager v1.0-programvare. Denne analyseprofilen inneholder alle nødvendige parametere for termosykling og analysering av forsøket. Det er 2 typer QIASure Assay Profile:
 - QIASure-analyseprofilen for livmorhalsskraper (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) brukes for livmorhalsprøver tatt av lege.
 - QIASure-analyseprofilen for børstprøver tatt av pasient (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) brukes for vaginale børstprøver tatt av pasient. Profilene kan lastes ned fra QIASure Methylation Test-nettsiden: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Analyseprofilen må importeres i programvaren Rotor-Gene AssayManager.

Merk: QIASure-settet kan bare kjøres hvis visse konfigurasjonsinnstillinger i Rotor-Gene AssayManager v1.0 er programmert.

Av systemsikkerhetshensyn må følgende konfigurasjonsinnstillinger stilles inn for lukket modus:

- "Material number required" (Krever materialnummer)
- "Valid expiry date required" (Krever gyldig utløpsdato)
- "Lot number required" (Krever lotnummer)

Installering av Epsilon Plug-in og import av analyseprofilen

Installasjon og import av Epsilon Plug-in og analyseprofilen er beskrevet i *brakerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager Core Application* og *brakerhåndboken for Epsilon Plug-In*.

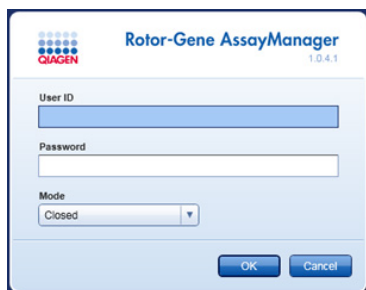
- Last ned både Epsilon Plug-in og den siste versjonen av QIASure Assay Profile fra QIAGENs nettsted.
- Start installeringsprosedyren ved å dobbeltklikke på filen EpsilonPlugin.Installation.msi, og følg installeringsinstruksjonene. En detaljert beskrivelse av denne prosessen finnes i avsnittet om installasjon av plugin-moduler i *brakerhåndboken for AssayManager Core Application*.

Merk: Av systemsikkerhetshensyn velger du fanen Settings (Innstillinger) og merker av i boksene Material number required (Krever materialnummer), Valid expiry date required (Krever gyldig utløpsdato) og Lot number required (Krever lotnummer) for lukket modus (i delen Work list (Arbeidsliste)). Hvis de ikke er aktivert (merket av), klikker du for å aktivere dem.

- Etter vellykket installasjon av plugin-modulen vil en person med administratorrettigheter for Rotor Gene AssayManager-programvaren måtte importere analyseprofilen AP_QIASure_V1_0_Y.iap på følgende måte:

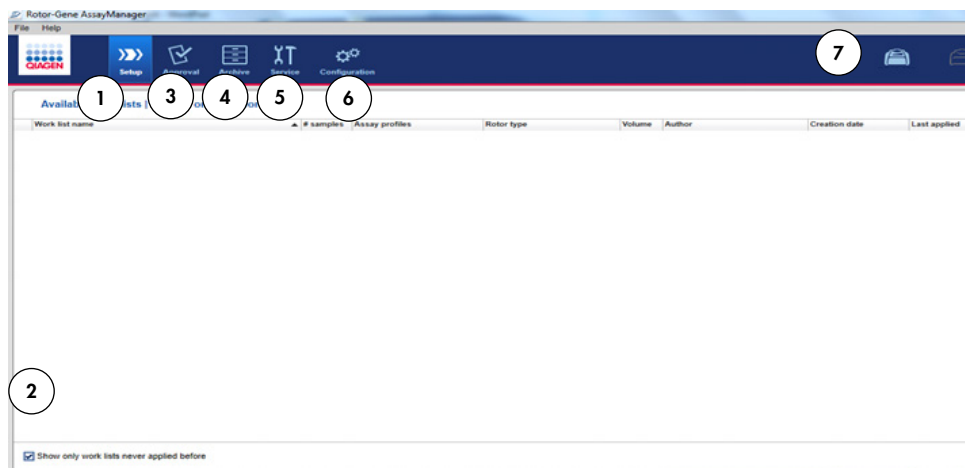


1. Åpne programvaren Rotor-Gene AssayManager ved å klikke på ikonet. Rotor-Gene AssayManager-vinduet åpnes (se figur 1).



Figur 1. Skjermbilde for pålogging i Rotor-Gene AssayManager.

2. Logg inn på Rotor-Gene AssayManager med bruker-ID og passord. Ikke endre modusen "Closed" (Lukket). Klikk på OK. Skjermbildet Rotor-Gene Assay Manager åpnes (se nedenfor).



- 1 Fanen Set-up (Oppsett). I denne fanen kan du administrere eller bruke arbeidslister.
- 2 Kontroll av benyttede arbeidslister viser bare nye arbeidslister.
- 5 Fanen Service. Viser en rapport over en revisjonssporing for hver fil som programvaren har generert.
- 6 Fanen Configuration (Konfigurasjon). Gjør det mulig å konfigurere alle programvareparametere.

3 Fanen Approval (Godkjenning). Denne fanen gjør at du kan finne tidligere forsøk (kjøringer).

4 Fanen Archive (Arkiv). Gjør at du kan finne gamle forsøk (kjøringer) som allerede var godkjent.

7 Rotor-Gene Q MDx-ikoner.



Ikke tilkoblet



Tilkoblet

3. Velg konfigurasjonsmiljøet.

4. Velg fanen Assay Profiles (Analyseprofiler).

5. Klikk på Import (Importer).

6. Velg analyseprofilen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap for livmorhalsprøver og/eller analyseprofilen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap for import i dialogboksen, og klikk på Open (Åpne).

7. Når analyseprofilen er importert, kan den brukes i miljøet "Setup" (Oppsett).

Merk: Samme versjon av en analyseprofil kan ikke importeres to ganger.

Prøvebehandling på Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med rotor for 72 rør

Opptil 70 bisulfittkonverterte DNA-prøver kan testes innenfor samme kjøring (forsøk), foruten en kalibrator og ikke-templatkontroll. Skjemaet i tabell 1 gir et eksempel på lasteblokk- eller rotoroppsettet for en kjøring med QIASure Methylation Test. Tallene angir posisjoner i lasteblokken og indikerer endelig rotorposisjon.

Tabell 1. Plate- og rotoroppsett for en kjøring med QIASure-settet på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet

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

FORSIKTIG

Rør må settes inn i rotoren som angitt i tabell 1. Det automatiserte analysesettet i analyseprofilen er basert på denne organiseringen. Hvis det brukes et annet oppsett, vil resultatene bli feil.

Merk: Fyll alle ubrukte posisjoner med tomme rør.

PCR på Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med rotor for 72 rør

Før dagens første kjøring skal det utføres en oppvarmingskjøring for Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM ved 95 °C i 10 minutter.

1. Opprett en arbeidsliste for prøvene som skal behandles, på følgende måte:
 - 1a. Slå PÅ Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.
 - 1b. Åpne Rotor-Gene AssayManager-programvaren, og logg inn som en bruker med operatørrolle i lukket modus.
 - 1c. Klikk på New work list (Ny arbeidsliste) i arbeidslisteadministratoren (i miljøet "Setup" (Oppsett)).
 - 1d. Velg QIASure Assay Profile fra listen over tilgjengelige analyseprofiler.

Merk: Analyseprofilen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap brukes for livmorhalsprøver. Analyseprofilen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap brukes for vaginale børsteprøver tatt av pasient.

Merk: Bare én prøvetype per forsøk kan testes.
 - 1e. Klikk på Move (Flytt) for å overføre analyseprofilen til listen Selected assay profiles (Valgte analyseprofiler). Analyseprofilen skal nå vises i listen "Selected assay profiles" (Valgte analyseprofiler).
 - 1f. Angi antall prøver i det tilhørende feltet.
 - 1g. Legg inn følgende QIASure-settinformasjon, som er angitt på lokket på esken.
 - Materialnummer: 1102417
 - Gyldig utløpsdato ved hjelp av formatet ÅÅÅÅ-MM-DD
 - Lotnummer

- 1h. Velg trinnet Samples (Prøver). En liste med prøvedetaljene vil bli vist på skjermbildet AssayManager. Denne listen representerer det forventede oppsettet for rotoren.
- 1i. Legg inn prøveidentifikasjonsnummeret/-numrene i listen samt all annen valgfri informasjon om prøvene som kommentar til hver enkelt prøve.
- 1j. Velg trinnet Properties (Egenskaper) og legg inn et arbeidslistenavn (figur 2).

Figur 2. Properties (Egenskaper)

- 1k. Bekreft avmerkingsboksen is applicable (kan aktiveres), og klikk på Apply (Aktiver).
- 1l. Lagre arbeidslisten.

Arbeidslisten kan skrives ut, noe som kan hjelpe til med klargjøring og oppsett av PCR. Klikk på Print work list (Skriv ut arbeidsliste) for å skrive ut arbeidslisten.

Prøveinformasjon er inkludert som en del av arbeidslisten.

Merk: Arbeidslisten kan opprettes så snart kjøringen er klar i instrumentet, eller arbeidslisten kan lagres før prøvene legges til i instrument.

2. Sett opp QIASure-kjøringen.

For å begrense risikoen for PCR-reaksjonskontaminering anbefales det på det sterkeste at et PCR-skap med UV-strålingsfunksjon brukes.

Overføring av QIASure Master Mix må utføres i et område atskilt fra området der DNA-bisulfittkonverteringsreaksjonen utføres.

Rengjør benkområdet, pipettene og rørstativet før bruk med en DNA-degraderende løsning for å forehindre templat- eller nukleasekontaminering.

Merk: Bytt spisser mellom hvert rør for å unngå eventuell ikke-spesifikk templat- eller reaksjonsblandingskontaminering, noe som kan føre til falskt positive resultater.

2a. Tin QIASure Master Mix og QIASure Calibrator fullstendig, og beskytt QIASure Master Mix mot lys dersom det er mulig.

Merk: Ikke la opptiningstrinnet overstige 30 minutter for å unngå degradering av materiale.

2b. Bland forsiktig ved å vende 10 ganger, og sentrifuger deretter kort før bruk.

2c. Overfør 17,5 µl av den bruksklare QIASure Master Mix til egnede remserør. Reaksjonsoppsettet kan skje ved romtemperatur.

2d. Sett QIASure Master Mix tilbake i fryseren for å unngå eventuell degradering av materiale.

2e. Transporter rør til eget område for å overføre analysekontrollene og de bisulfittkonverterte prøvene.

2f. Tilsett 2,5 µl vann i ikke-templatkontrollen (No template control, NTC) i posisjon 2 (se tabell 1 ovenfor). Bland forsiktig ved å pipettere opp og ned.

2g. Tilsett 2,5 µl QIASure Calibrator i posisjon 1 (se tabell 1 ovenfor). Bland forsiktig ved å pipettere opp og ned, og lukk røret med et lokk.

2h. Tilsett 2,5 µl bisulfittkonvertert DNA i det tilhørende røret. Bland forsiktig ved å pipettere opp og ned.

2i. Når et sett med 4 rør er fylt, skal det settes kork på rørene.

Merk: PCR-rørene kan oppbevares i 30 minutter mellom pipettering av prøver i PCR-rørene og start av forsøket i maskinen ved 2-8°C i mørket.

2j. Sett QIASure Calibrator tilbake i fryseren for å unngå eventuell degradering av materiale.

Merk: Bytt spisser mellom hvert rør for å unngå eventuell ikke-spesifikk templat- eller reaksjonsblandingskontaminering, noe som kan føre til falskt positive resultater.

3. Klargjør Rotor-Gene Q MDx, og start kjøringen (forsøket) på følgende måte:

3a. Sett en rotor med 72 brønner inn i rotorholderen.

3b. Fyll rotoren med røremser i henhold til tildelte posisjoner, start i posisjon 1, som vist i , med tomme lukkede rør plassert i alle ubrukte posisjoner.

Merk: Forsikre deg om at det første røret er satt inn i posisjon 1, og at remserørene er plassert i riktig retning og posisjon, som vist i tabell 1.

3c. Fest låseringen.

3d. Sett inn rotoren og låseringen i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og lukk instrumentlokket.

3e. I Rotor-Gene AssayManager v1.0-programvaren velger du den tilhørende arbeidslisten fra arbeidslisteadministratoren og klikker på Apply (Bruk). Hvis arbeidslisten fortsatt er åpen, klikker du på Apply (Bruk).

Merk: Hvis arbeidslisten for kjøringen ikke er opprettet, logger du inn på Rotor-Gene AssayManager v1.0 og følger trinn 1 før du går videre.

3f. Skriv inn kjøringens (forsøkets) navn.

3g. Velg sentrifugen som skal benyttes, på listen Cyclers Selection (Sentrifugevalg).

3h. Kontroller at låseringen er satt på riktig, og bekreft på skjermen at låseringen er festet.

3i. Klikk på Start experiment (Start forsøk).

QIASure Methylation Test-kjøringen skal starte.

4. Når kjøringen er fullført, klikk på Finish run (Fullfør kjøring).

5. Frigi og godkjenn kjøringen.

- Brukere som er logget inn med rollen Approver (Godkjenner), kan klikke på Release and go to approval (Frigi og gå videre til godkjenning).
- Brukere som er logget inn med rollen Operator (Operatør), kan klikke på Release (Frigi).

6. Frigi resultater.

- Dersom du klikket på Release and go to approval (Frigi og gå videre til godkjenning), vises resultatene fra forsøket.
- Dersom en bruker med brukerrolle klikket på Release (Frigi), må noen med rollen Approver (Godkjenner) logge seg inn og velge miljøet Approval (Godkjenning).
- Filtrer analysen som skal godkjennes, ved å velge filteralternativene og klikke på Apply (Bruk).
- Gjennomgå resultatene, og godkjenn resultatene av hver testprøve.

I tabellen Results (Resultater) blar du til prøven som skal godkjennes. Hvert prøveresultat som skal godkjennes, har tre alternativknapper på den enden av den relevante raden.

Resultatet av en prøve må enten godtas eller avvises.

Merk: Et resultat automatisk satt til INVALID (Ugyldig) av Rotor-Gene AssayManager kan ikke konverteres til et gyldig resultat lenger, selv om resultatet avvises.

Eventuelt: Skriv inn en kommentar i kolonnen Sample comment (Prøvekommentar).

- Klikk på Release/Report data (Frigi/rapporter data).
- Klikk på OK. Rapporten vil bli generert i PDF-formatet (Adobe Portable Document format) og lagres automatisk i den forhåndsdefinerte mappen. Mappebanen er som standard: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports** (Eksporter > Rapporter)

Merk: Denne banen og mappen kan endres i miljøet "Configuration" (Konfigurasjon).

- Gå til fanen Archive (Arkiver) for å eksportere .rex-filen, tilsvarende rådataene. Finn forsøket ditt ved hjelp av filteralternativene, og klikk på show assays (vis analyser). Klikk deretter på Export .rex file (Eksporter .rex-fil), og lagre den ved å klikke på OK. Programvaren lagrer .rex-filen automatisk i følgende forhåndsdefinerte mappe: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments** (Eksporter > Eksperimenter)

Merk: Denne banen og mappen kan endres i fanen Specify the .rex file export destination (Angi mål for .rex-fileksport).

Merk: Ved feilsøking kan det være behov for en støttepakke fra kjøringen. Støttepakker kan genereres fra miljøet "Approval" (Godkjenning) eller "Archive" (Arkiv). Se *brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager Core Application*, Feilsøking, "Creating a support package" (Opprette en støttepakke) på <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. I tillegg kan revisjonssporingen fra tidspunktet for hendelsen, ±1 dag, være til hjelp. Revisjonssporingen kan hentes i miljøet Service (*brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Tøm Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og kast rørene i remser i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

Tolkning av resultater

Analysen er helautomatisert.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyserer først amplifikasjonskurver, og kan ugyldiggjøre feilaktige kurver, avhengig av form og støyamplitude. Hvis dette er tilfellet, vil et flagg bli knyttet til den ugyldiggjorte kurven (se tabell 2).

Rotor-Gene AssayManager v1.0 vil deretter analysere kjøringskontrollene.

- Kalibrator
- NTC

Merk: Rapporten som genereres mot slutten av kjøringen, viser resultatene som ble innhentet for kjøringskontroller med flagg foran ugyldige data.

Hvis alle kontrollene i serien samsvarer, vil Rotor-Gene AssayManager analysere de ukjente prøvene.

Tabell 2 viser de ugyldiggjørende prøveflaggene som kan tildeles til et enkelt rør under analysen med Rotor-Gene AssayManager v1.0, sammen med en forklaring på hva flagget betyr.

Tabell 2. Ugyldiggjørende prøveflagg og beskrivelse av uttrykk

Flagg	Atferd	Beskrivelse
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ugyldig)	Målverdien er høyere enn det definerte området. Dette kan være en C_T -endepunktfluorescens, konsentrasjon eller beregnet verdi, f.eks. gjennomsnittlig C_T eller ΔC_T .
ASSAY_INVALID	Invalid (Ugyldig)	Analysen er ugyldig fordi minst én ekstern kontroll er ugyldig.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ugyldig)	Målverdien er lavere enn det definerte området. Dette kan være en C_T -endepunktfluorescens, konsentrasjon eller beregnet verdi, f.eks. gjennomsnittlig C_T eller ΔC_T .
CONSECUTIVE_FAULT	Invalid (Ugyldig)	Et mål som er brukt til beregning av dette målet, er ugyldig.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Invalid (Ugyldig)	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater.
FLAT_BUMP	Invalid (Ugyldig)	Amplifikasjonskurven for rådata viser en form som en flat hump som avviker fra det etablerte forløpet til denne analysen. Det er stor sannsynlighet for feil resultater eller feiltolkning av resultater (f.eks. feil bestemmelse av C_T -verdi).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Gyldig)	NTC viser signal- C_T -verdier over 36 for mål-ACTB.
INVALID_CALCULATION	Invalid (Ugyldig)	Beregning for dette målet mislyktes.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Invalid (Ugyldig)	Amplifikasjonskurven krysser terskelen mer enn én gang. En utvetydig C_T kan ikke bestemmes.
NO_BASELINE	Invalid (Ugyldig)	Ingen startverdi for den initielle baseline er funnet.
NO_CT_DETECTED	Variabel	Ingen C_T er registrert for dette målet.
NO_VALUE	Invalid (Ugyldig)	Målet har ingen verdi, men forventes å ha det. Denne verdien må ikke være i et visst område. Dette kan være en C_T -endepunktfluorescens, konsentrasjon eller beregnet verdi (f.eks. gjennomsnittlig C_T eller ΔC_T).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Warning (Advarsel)	Avvik under normaliseringsprosedyren. Amplifikasjonskurven vises med en standard normalisering; resultatene skal kontrolleres manuelt med hensyn til korrekthet.
OTHER_TARGET_INVALID	Invalid (Ugyldig)	Et annet mål for samme prøve er ugyldig.

SATURATION (Metning)	Invalid (Ugyldig)	Rådatafluorescensen mettes i stor grad før amplifikasjonskurvens infleksjonspunkt.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warning (Advarsel)	Rådatafluorescensen mettes i amplifikasjonskurvens platåfase.
SPIKE	Warning (Advarsel)	Et utslag er detektert i rådatafluorescensen i amplifikasjonskurven, men utenfor området hvor C_T bestemmes.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Invalid (Ugyldig)	Et utslag er detektert i amplifikasjonskurven i nærheten av C_T .
STEEP_BASELINE	Invalid (Ugyldig)	En bratt stigende baseline for rådatafluorescens er detektert i amplifikasjonskurven.
STRONG_BASELINE_DIP	Invalid (Ugyldig)	Et stort fall i baseline for rådatafluorescens påvises i amplifikasjonskurven.
STRONG_NOISE	Invalid (Ugyldig)	Sterk støy utenfor vekstfasen i amplifikasjonskurven påvises.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Invalid (Ugyldig)	Sterk støy er detektert i vekstfasen (eksponentiell fase) i amplifikasjonskurven.
UNCERTAIN	Variabel	Resultater fra AUDAS strider med resultater fra kjerneanalysen. En utvetydig automatisk vurdering av datagylldighet er ikke mulig.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variabel	En C_T -verdi registreres for et mål som ikke skal amplifiseres.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Ugyldig)	Målet har en verdi, men det er ikke en forventet verdi. Dette kan være en C_T -endepunktfluorescens, konsentrasjon eller beregnet verdi, f.eks. gjennomsnittlig C_T eller ΔC_T .
UPSTREAM	Variabel	Prøvestatus ble satt til Invalid (Ugyldig) eller Unclear (Uklar) ved en oppstrømsprosess (f.eks. QIAasympmony). Merk: For prøver som er flagget som uklare, er atferden til Rotor-Gene AssayManager definert i miljøet "Configuration" (Konfigurasjon) i AssayManager-programvaren. "Invalid" (Ugyldig) flagg fra oppstrømsprosesser fører alltid til en ugyldig tilsvarende prøve i Rotor-Gene AssayManager.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Invalid (Ugyldig)	En bølgeformet baseline for rådatafluorescens påvises i amplifikasjonskurven.

- Hvis alle kontrollene i kjøringen er gyldige, vil Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysere de ukjente prøvene. I prøven må en minimal mengde bisulfittkonvertert DNA

være til stede for at resultatene skal kunne tolkes. Dette er angitt av C_T -verdien av husholdningsgenet ACTB, som må være $\leq 26,4$ for at en prøve skal kunne valideres av Rotor-Gene AssayManager.

- $\Delta\Delta C_T$ -verdiene for FAM19A4 og hsa-mir124-2 vil deretter bli beregnet, og resultatet vil bli gitt. Hvis en $\Delta\Delta C_T$ -verdi er under grenseverdien, scores målet som "Hypermethylation positive" (Hypermetyleringspositiv).

Merk: Partielle eller lave metyleringsnivåer er et naturlig forekommende fenomen som, i motsetning til hypermetyleringsnivåer, ikke er direkte knyttet til utviklingen av kreft.

- En prøve anses som "Hypermethylation positive" (Hypermetyleringspositiv) når minst ett av målene scores som "Hypermethylation positive" (Hypermetyleringspositiv).
- Prøver med lav DNA-kvalitet/kvantitet (dvs. ACTB C_T -verdier like innenfor godkjenningskriteriet; C_T -verdier fra 25 til 26,4) kan scores som falskt negative. Gjentatt enkelttesting av PCR tilrådes. Et negativt resultat for den gjentatte testen betyr at prøven er hypermetyleringsnegativ, mens et positivt resultat betyr at prøven er hypermetyleringspositiv.
- Prøver med høy cellularitet som behandles med en direkte konverteringsprotokoll, risikerer å overbelaste PCR-reaksjonen med DNA, noe som kan føre til et falskt negativt resultat for FAM19A4-målet. For prøver med 1) et negativt hypermetyleringsresultat, 2) en ACTB C_T -verdi på ≤ 23 og 3) en FAM19A4 $\Delta\Delta C_T$ -verdi på mellom 10,36 og 11,36, anbefales det derfor å gjenta PCR med 5 ganger mindre mengde konvertert DNA ved å fortynne prøven i vann.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdelinger er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til www.qiagen.com).

Informasjon om feilsøking av Rotor-Gene AssayManager finnes i *brukerhåndboken for Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Kommentarer og forslag

Generell håndtering

Prøve-DNA-konsentrasjon for lav for bisulfittkonvertering

Kontroller DNA-ekstrakt	Gjenta DNA-ekstraksjon med mer konsentrert klinisk prøve
-------------------------	--

Prøve scores som ugyldig: Amplifikasjonen av ACTB er for lav eller fraværende

- | | |
|--|---|
| a) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser | Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen. |
| b) Kontroller DNA-konsentratet | Øk DNA-tilførselen for bisulfittkonvertering til et maksimum. Bisulfittkonverteringsreaksjon har optimal ytelse for DNA-tilførsel i området 100 ng til 2 µg |
| c) For protokollen for bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøve skal den kliniske prøven kontrolleres for cellularitet | Gjenta bisulfittkonverteringsreaksjonen med 10 % av livmorhalsprøven i PreservCyt-prøvetakingsmedium (dvs. 2 ml fra 20 ml). |
| d) Kontroller det bisulfittkonverterte eluatet | Gjenta bisulfittkonvertering. Om nødvendig kan det brukes en høyere DNA-tilførsel. |

Prøve scores som ugyldig: Målene FAM19A4 og/eller hsa-mir124-2 er ugyldige

Utilstrekkelig blanding	Bland prøve og reaksjonsblanding ved pipettering (ca. 10 ganger per rør). Gjenta prøve.
-------------------------	---

Kommentarer og forslag

Positiv kontroll får ugyldig resultat: Amplifikasjonen er for lav eller fraværende for ett eller flere av målene

a) Pipetteringsfeil eller utelatte reagenser	Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen.
b) Delvis degradering	Oppbevar settets innhold ved -30 til -15 °C. Unngå gjentatt frysing og tining til høyst tre sykluser.
c) PCR-reagenser delvis degradert	Oppbevar settets innhold ved -30 til -15 °C, og oppbevar reaksjonsblandingen beskyttet mot lys. Unngå gjentatt frysing og tining.
d) Ombytting av remserør	Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.
e) Holdbarhetsdato	Kontroller det benyttede settets utløpsdato.
f) Forsinkelse mellom prøvepipettering og starten av kjøringen	PCR-reaksjonsblandinger kan oppbevares ved $2-8$ °C i 30 minutter i mørket mellom overføring av prøver til PCR-reaksjonene og start av kjøringen i maskinen.

Ikke-templatkontroll (No template control, NTC) er ugyldig

a) Pipetteringsfeil	Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen.
b) Krysskontaminering	Bytt ut alle kritiske reagenser. Sørg for alltid å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksartikler i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering.
c) Reagenskontaminering	Bytt ut alle kritiske reagenser. Sørg for alltid å håndtere prøver, settkomponenter og forbruksartikler i samsvar med allment akseptert praksis for å forhindre medrivingskontaminering.
d) Ombytting av remserør	Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet.
e) Forsinkelse mellom prøvepipettering og starten av kjøringen	PCR-reaksjonsblandinger kan oppbevares ved $2-8$ °C i 30 minutter i mørket mellom overføring av prøver til PCR-reaksjonene og start av kjøringen i maskinen.
f) Probedegradering	Oppbevar reaksjonsblandinger beskyttet mot lys. Kontroller for falskt positive resultater på fluorescenskurven.

Fraværende eller lave signaler i prøve, men kontrollkjøringen er ok

a) Hemmende effekter	Alltid kontroller at det ikke er noen bufferrester på filteret etter sentrifugering under bisulfittkonvertering. Gjenta bisulfittkonvertering.
b) Pipetteringsfeil	Kontroller pipetteringsskjemaet og reaksjonsoppsettet. Gjenta PCR-kjøringen.

Hvis problemet vedvarer, ta kontakt med QIAGENs tekniske serviceavdeling.

Begrensninger

QIASure Methylation Test-reagenser kan utelukkende brukes til in vitro-diagnostikk.

Bruk av PCR-tester krever god laboratoriepraksis, inkludert vedlikehold av utstyr som er dedikert til molekylærbiologi og i samsvar med gjeldende regelverk og relevante standarder.

Reagenser og instruksjoner i dette settet er godkjent for optimal ytelse.

QIASure Methylation Test skal brukes av laboratorieteknikere som har fått opplæring i bruk av Rotor-Gene Q MDx-instrumentene og Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Produktet skal bare brukes av personale som har fått særlig instruksjon og opplæring i teknikkene for real-time PCR og i in vitro-diagnostiske prosedyrer. Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn.

Håndboken må følges nøye for å sikre optimale PCR-resultater.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene som er angitt på komponentenes esker og etiketter. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato.

Prøver med lav DNA-kvalitet/kvantitet (dvs. ACTB C_T -verdier like innenfor godkjeningskriteriet; C_T -verdier fra 25 til 26,4) kan scores som falskt negative. Gjentatt enkelttesting tilrådes. Et negativt resultat for den gjentatte testen betyr at prøven er hypermetyleringsnegativ, mens et positivt resultat betyr at prøven er hypermetyleringspositiv.

Alle reagensene som leveres med QIASure Methylation Test, er utelukkende beregnet for bruk sammen med de andre reagensene i det samme settet. Dette kan påvirke ytelsen på annen måte.

QIASure Methylation Test er validert for HPV-positive kvinner.

QIASure Methylation Test er validert for livmorhalsprøver tatt og oppbevart i PreservCyt, SurePath™ eller STM-prøvetakingsmedium og for vaginale børsteprøver som har vært oppbevart i PreservCyt ved ankomst til laboratoriet.

Bare Rotor-Gene Q MDx er validert for bruk med QIASure Methylation Test PCR-analysen.

Annen bruk av dette produktet enn det som angis på etikettene, og/eller modifisering av komponentene vil annullere Self-screen B.V.s ansvar.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av Self-screens ytelsesundersøkelser.

Ytelsesegenskaper

Deteksjonsgrense (LOD)

Den analytiske sensitiviteten til QIASure Methylation Test ble bestemt som 95 %-deteksjonsgrensen (95 %-LOD) ved bruk av en seriefortynningsserie av plasmid som inneholder alle tre amplikonsekvenser (dvs. *ACTB*, *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*; området 750 000 til 0,25 kopier per PCR). 95 % LOD for målet ble vurdert som den laveste plasmidfortynningen som gir minst 35 av 36 positive resultater ($C_T < 40$). I alt ble det utført 12 forsøk av fire forskjellige operatører (1 serie per operatør per dag) ved bruk av tre forskjellige loter og tre forskjellige RGQ-systemer. Hvert forsøk inkluderte triplikattesting av 11 plasmidfortynninger. 95 % LOD var 7,5 kopier per PCR for alle de tre forskjellige målene.

Linearitet

Linearitet for QIASure-analysen ble bestemt med dataene fra de 12 forsøkene som ble utført for å vurdere 95 % LOD. De to målene, *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*, og referanse-*ACTB*-en har lineær amplifikasjon fra 750 000 opptil 7,5 kopier per PCR.

Presisjon

QIASure Methylation Test-presisjonen ble bestemt som variabilitet innenfor analyse (variabilitet av flere resultater av prøver med samme konsentrasjon innenfor ett forsøk) og total varians av analysen (variabilitet av flere resultater av analysen generert av forskjellige operatører, på forskjellige instrumenter, med forskjellige partier, i forskjellige laboratorier). Testing ble utført på bisulfittkonvertert DNA oppnådd fra en høyrisiko-HPV-positiv livmorhalsprøve som testet hypermetyleringspositivt med signaler for både *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* tilsvarende ca. 3 ganger LOD-konsentrasjonen. Testing ble utført i duplikat i 8 kjøring av fire forskjellige operatører (én kjøring per operatør per dag) ved bruk av to forskjellige loter og tre forskjellige RGQ-maskiner i to forskjellige laboratorier, noe som ga opphav til 16 datapunkter per prøve.

Variasjonskoeffisienten (Coefficient of variation, CV) ble bestemt for C_T- og ΔΔC_T-verdiene (tabell 3).

Tabell 3. CV % av C_T- og ΔΔC_T-verdier i en metyleringspositiv livmorhalsprøve

	Prøvetype	Prøvetype (%)	Prøvetype (%)
CT-verdi	Intern kvalitetkontroll for prøve (dvs. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
ΔΔCT-verdi	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Den samlede statistiske spredningen i C_T-verdier av en prøve med nevnte konsentrasjon er 1,32 % for den interne kvalitetskontrollen for prøven (ACTB), 1,52 % for FAM19A4 og 1,64 % for hsa-mir124-2. Den samlede statistiske spredningen i ΔΔC_T-verdier av en prøve med nevnte konsentrasjon er 5,97 % for FAM19A4 og 5,75 % for hsa-mir124-2.

Interfererende stoffer

Inhiberende stoffer valgt for deres potensielle effekt på PCR var bisulfittkonverteringssettets svovelfjernings- og vaskebuffer. Stoffer som potensielt finnes i originalprøven, ble ikke testet, i og med at prøve-DNA renses to ganger med silikakuler, dvs. DNA-ekstraksjon fra originalprøve og DNA-rensing etter bisulfittkonvertering. Spor av svovelfjernings- og vaskebufferen viste interferens i PCR, noe som ble detektert av et ugyldig testresultat for den interne kvalitetskontrollen for prøven.

Klinisk ytelse

HPV-positive livmorhalsprøver*

Den kliniske ytelsen av QIASure Methylation Test for cervikal intraepitelial neoplasi grad 3 (CIN 3) og livmorhalskreft (dvs. CIN 3+) ble vurdert i en retrospektiv EU-multisenterstudie (13). QIASure Methylation Test ble evaluert på 2384 HPV-positive screeningprøver fra livmorhals hos kvinner (29–76 år) fra fire EU-land (Skottland, Slovenia, Danmark og Nederland)(13). Prøvene ble tatt i PreservCyt- eller SurePath-medier. Studiepopulasjonen besto av 2012 kvinner uten tegn på sykdom innen 2 års oppfølging (forkortet $\leq$ CIN 1), 124 med CIN 2, 228 med CIN 3 og 20 med kreft. DNA ble ekstrahert fra livmorhalsprøvene, og 250 ng DNA ble brukt for tilførsel i bisulfittkonverteringsreaksjonen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Av 250 ng modifisert DNA ble 20 % brukt i PCR (tilsvarende 50 ng originalmål-DNA/PCR). De samlede positivitetsratene for QIASure Methylation Test stratifisert etter klinisk endepunkt angis nedenfor (tabell 4).

Tabell 4. Positivitetsrater for QIASure Methylation Test

Klinisk endepunkt	Fraksjon	Positivitetsrate (95 % KI)
$\leq$ 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)
Livmorhalskreft	19/20	95,0 % (70,7–99,3)

Blant høyrisiko-HPV-positive livmorhalsprøver er sensitiviteten for CIN 3+ 78,6 % (195/248; 95 % KI: 73,1–88,3), og den totale spesifisiteten til QIASure Methylation Test var 78,3 % (n = 2013; 95 % KI: 76–80). Den negative prediktive verdien for hrHPV-positive, metyleringsnegative utfall var 99,9 % for livmorhalskreft (N = 1694; 95 % KI): 99,6–99,99), 96,9 % for CIN3+ (95 % KI: 96–98) og 93,0 % for CIN2+ (95 % KI: 92–94).

I tillegg ble sensitiviteten for livmorhalskreft evaluert i en internasjonal retrospektiv multisenterstudie av 519 invasive kreftformer med ulike histotyper fra over 25 land (11). DNA ble ekstrahert fra livmorhalsprøvene, og 250 ng DNA ble brukt for tilførsel i

* Livmorhalsprøver tatt av lege.

bisulfittkonverteringsreaksjonen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Av 250 ng modifisert DNA ble 20 % brukt i PCR (tilsvarende 50 ng originalmål-DNA/PCR). 510 av de 519 krefttilfellene testet positivt med QIASure Methylation Test, noe som gir en positivitetsrate på 98,3 % (95 % KI): 96,7–99,2). Positivitetsratene stratifisert per histotype er angitt nedenfor i Tabell 5. Positivitetsrate for QIASure Methylation Test i livmorhalskreftprøver.

Tabell 5. Positivitetsrate for QIASure Methylation Test i livmorhalskreftprøver

Klinisk endepunkt	Fraksjon	Positivitetsrate (95 % KI)
Plateepitelkarsinom	313/318	98,4 % (96,4–99,5)
Adenokarsinom	121/123	98,4 % (94,2–99,8)
Adenoksvamøst cellekarsinom	42/42	100,0 % (91,6–100)
Sjeldne kreft histotyper	30/32	93,8 % (79,2–99,2)
Kreft uten spesifisert histotype	4/4	100 % (39,8–100,0)

HPV-positive vaginale børsteprøver tatt av pasient

Den kliniske ytelsen av QIASure Methylation Test for vaginale børsteprøver tatt av pasient for å detektere cervical intraepitelial neoplasia grad 3 (CIN 3) og livmorhalskreft (dvs. CIN 3+) ble vurdert ved testing av 247 høyrisiko-HPV-positive vaginalprøver. For 14 prøver (5,7 %) var ACTB C_T-verdiene > 26,4 og ble deretter scoret som ugyldige. Prøvene med gyldige testresultater omfattet 148 børsteprøver tatt av pasient av kvinner med ≤ CIN 1 etter 18 måneders oppfølging, 24 med CIN 2, 50 med CIN 3, 8 med plateepitelkarsinom og 3 med adenokarsinom. DNA ble ekstrahert fra vaginalprøvene, og 250 ng DNA ble brukt for tilførsel i bisulfittkonverteringsreaksjonen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Av 250 ng bisulfittkonvertert DNA ble 20 % brukt i PCR (tilsvarende 50 ng originalmål-DNA/PCR). Positivitetsratene for QIASure Methylation Test stratifisert etter klinisk endepunkt angis nedenfor (tabell 6).

Tabell 6. Positivitetsrater for QIAzure Methylation Test i vaginale børsteprøver tatt av pasient

Klinisk endepunkt	Fraksjon	Positivitetsrate (95 % KI)
≤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)
Plateepitelkarsinom	8/8	100,0 % (63,1–100,0)
Adenokarsinom	3/3	100,0 % (29,2–100,0)

Blant høyrisiko-HPV-positive vaginale børsteprøver tatt av pasient er sensitiviteten for CIN 3+ 72,1 % (44/61; 95 % KI: 59,7–81,9) og for karsinom 100 % (11/11; 95 % KI: 72–100). *

Ytelsen til *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* for å detektere fremskredne transformerende CIN-lesjoner

Analyse av promotermetylering hos vertsceller detekterer nærmere bestemt såkalt "fremskredne" CIN-lesjoner, som har en kreftlignende metyleringsprofil og en forventet stor kortsiktig risiko for å utvikle seg til kreft (7, 8). Ytelsen til promoterhypermetyleringsanalyse av *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* ble vurdert ved testing av 29 høyrisiko-HPV-positive prøver fra kvinner med fremskreden transformerende CIN 2/3 og 19 høyrisiko-HPV-positive prøver fra kvinner med tidlig transformerende CIN 2/3. Metylering var særlig assosiert med fremskreden sykdom, som scoret alle fremskredne CIN2/3-lesjoner (100 %; 29/29; 95 % KI: 88–100) hypermetyleringspositive, sammenlignet med 47 % (9/19; 95 % KI: 27–69) av tidlige CIN 2/3-lesjoner.

Robusthet

QIAzure Methylation Test-robustheten ble bestemt som samsvaret mellom resultatet av QIAzure Methylation Test og resultatet av en RUO-versjon av analysen. Testing ble utført på bisulfittkonvertert genomisk DNA oppnådd fra 10 høyrisiko-HPV-positive livmorhalsprøver,

* Merk: Hypermetylering av målene i prøver fra kvinner med fremskreden CIN-lesjon og/eller livmorhalskreft kan passere udetektert på grunn av prøvetakingsvariabilitet, for eksempel som følge av ikke tilfredsstillende prøvetaking.

hvorav 5 tidligere ble identifisert som hypermetyleringsnegative for begge markører og 5 som metyleringspositive (f.eks. for minst én av de 2 markørene). Testing ble utført i duplikat i 8 kjøringar av fire forskjellige operatører (én kjøring per operatør per dag) ved bruk av to forskjellige loter og tre forskjellige Rotor-Gene Q MDx-instrumenter utført i to forskjellige laboratorier. I alt ble det oppnådd 16 datapunkter for hver prøve (tabell 7).

Tabell 7. Samsvar for QIAzure Methylation Test sammenlignet med RUO-versjon av analysen

Prøvenummer	RUO-resultat	Samsvar lab 1 sammenlignet med RUO	Samsvar lab 2 sammenlignet med RUO
1	Neg.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
2	Neg.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
3	Neg.	62,5 % (5/8)	62,5 % (5/8)
4	Neg.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
5	Neg.	100 % (8/8)	100 % (8/8)
Delsum		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)
Delsum		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Fire av de fem prøvene som tidligere var blitt identifisert som metyleringsnegative, viste 100 % samsvar ved bruk av QIAzure Methylation Test i begge laboratorier. Prøve 3 viste et samsvar på 62,5 % (5/8) i begge laboratorier. Observert variasjon knyttet til FAM19A4 med nivåer rundt analysens grenseverdi. Samlet samsvar blant de metyleringsnegative prøvene var 92,5 % (37/40).

Alle 5 prøver som tidligere var blitt identifisert som metyleringspositive, viste 100 % samsvar med referanseanalysen, slik at samlet samsvar var 100 % (40/40).

Bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøver

Protokollen "Bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøver ved bruk av EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit" ble kontrollert mot referanseprotokollen (dvs. bisulfittkonvertering med forutgående prøve-DNA-mengdekontroll) på 119 livmorhalsskrapinger etterfulgt av QIASure Methylation Test. Suksessprosenten for bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøver ved hjelp av tilførsel av 2,5 % livmorhalsprøve var 95,8 % (114/119) og økte til 100 % etter ny testing av de ugyldige verdiene med tilførsel av 10 % livmorhalsprøve. Samsvaret i QIASure Methylation Test-resultat mellom bisulfittkonverteringsprotokollene var 90,8 % (108/119; kappaverdi 0,75).

Protokollen "Bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøver ved bruk av QIAsymphony Bisulfite Kit" ble kontrollert mot referanseprotokollen (dvs. bisulfittkonvertering med forutgående prøve-DNA-mengdekontroll) på 120 livmorhalsskrapinger etterfulgt av QIASure Methylation Test. Suksessprosenten for bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøver ved hjelp av tilførsel av 2,5 % livmorhalsprøve var 94,2 % (113/120) sammenlignet med 97,5 % (117/120) med referanseprotokollen. Samsvaret i QIASure Methylation Test-resultat mellom bisulfittkonverteringsprotokollene var 94,7 % (107/113; kappaverdi 0,88).

Referanser

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

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:

Symbol	Symbolforklaring
	Brukes innen
	In vitro-diagnostisk medisinsk enhet
	CE-IVD-merket symbol
 <N>	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Komponenter
	Innhold
	Antall
Rn	R står for revisjon av bruksanvisningen (håndboken), og n er revisjonsnummeret
	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Produsent



Skal beskyttes mot lys



Se bruksanvisningen



Forsiktig

Kontaktinformasjon

Hvis du trenger teknisk hjelp eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportsenter på www.qiagen.com/Support, ringe 00800-22-44-6000 eller kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå til www.qiagen.com).

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
QIASure Methylation Test Kit	Til 72 reaksjoner: 2 masterblandinger, 2 kalibratorer.	616014
QIASymphony SP	QIASymphony-prøveklargjøringsmodul: Inkluderer 1 års garanti på deler og arbeid (valgfritt for automatisk ekstraksjon)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare og tilbehør: inkluderer 1-års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-sentrifuge og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, inkluderer 1-års garanti på deler og utføring; installasjon og opplæring ikke inkludert	9002032
Rotor-Gene Q MDx-tilbehør		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med ékanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901

Produkt	Innhold	Kat.nr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner	981106
Rotor-Gene AssayManager – for rutinetesting med Rotor-Gene Q MDx-instrumenter		
Rotor-Gene AssayManager	Programvare for rutinemessig testing i kombinasjon med Rotor-Gene Q- og QIAasymphony RGQ-instrumentene; programvare med én lisens for installasjon på én datamaskin	9022739

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, se håndboken eller bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

Denne siden er tom med hensikt.

Endringshistorikk for dokument

Date	Endringer
R4, juni 2019	Reviderte flytdiagrammet for arbeidsflytprosedyren i Prinsipp og prosedyre, la til EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit i Nødvendige materialer som ikke følger med, reviderte boksinnhold i Sikkerhetsinformasjon, la til informasjon om oppvarmingskjøring for RGQ MDx 5-plex HRM, reviderte avsnittet Prøveklargjøring, la til ytterligere feilsøkingselement, la til emnet Bisulfittkonvertering direkte på livmorhalsprøver i Ytelseegenskaper, Oppdaterte avsnittet Referanser, oppsettoppdateringer
R5, juli 2023	La til QIAsymphony-instrumentering for valgfri ekstraksjonsautomatisering og QIAsymphony Bisulfite Kit i Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger, reviderte avsnittet om prøveklargjøring, la til bruk av SurePath-prøvetakingsmedium, reviderte avsnittet om klinisk ytelse. La til overskrifter for tabell 5 og tabell 6.

Begrenset lisensavtale for QIASure Methylation Test

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens når det gjelder noen av QIAGENS åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet sammen med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse ytterligere protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller bruk av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet og komponentene i det er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller underforstått, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuell intellektuell eiendomsrett forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Self-screen B.V. er den juridiske produsenten av QIASure Methylation Test.

QIASure Methylation Test produseres av Self-screen B.V. og distribueres av QIAGEN i Europa.

Varemerker: 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.). Registrerte navn, varemerker, osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke anses som ubeskyttet ved lov, selv når de ikke er spesielt merket som sådan.

07-2023 HB-2304-005 1132288NB © 2023 QIAGEN, med enerett.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk støtte support.qiagen.com | Nettside www.qiagen.com