

jul 2023.

QIAzure™ Methylation Test

Uputstvo za upotrebu (priručnik)



Verzija 1

Za upotrebu sa instrumentom Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM



616014

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

1132288SR

Sadržaj

Namena.....	4
Sažetak i objašnjenje.....	5
Principi procedure	5
Obezbeđeni materijal	7
Sadržaj kompleta	7
Potreban materijal koji se ne isporučuje	7
Upozorenja i mere opreza	10
Informacije o bezbednosti	10
Opšte mere opreza	10
Mere predostrožnosti u vezi sa AssayManager profilima	12
Čuvanje reagensa i njihovo rukovanje.....	13
Rukovanje uzorcima i njihovo čuvanje.....	14
Priprema uzorka za uzorke koji se skladište u PreservCyt.....	16
Priprema uzoraka za uzorke koji se čuvaju u SurePath™.....	19
Opšte preporuke za bisulfitnu konverziju	20
Protokol: QIASure Methylation Test PCR u Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentu	21
Tumačenje rezultata	34
Vodič za rešavanje problema	38
Ograničenja	40
Karakteristike učinka	42
Ograničenje detekcije (LOD)	42

Linearnost	42
Preciznost	42
Ometajuće supstance	43
Klinički učinak.....	44
Robusnost.....	47
Reference.....	50
Simboli.....	52
Kontakt informacije	53
Informacije za naručivanje.....	54
Istorija revizija dokumenta	57

Namena

QIASure Methylation Test (kat. br. 616014) je multipleksno PCR ispitivanje specifično za metilaciju u realnom vremenu za detekciju hipermetilacije promotora gena *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*. Uzorci koji se mogu ispitati pomoću QIASure Methylation Test uključuju bisulfitno konvertovanu DNK izolovanu iz uzoraka prikupljenih na sledeće načine:

- Cervikalni uzorci prikupljeni sa *digene*® HC2 DNA Collection Device (prikupljeni od strane lekara)
- Cervikalni uzorci prikupljeni četkicom i stavljeni u PreservCyt® Solution ili u SurePath™ Solution (prikupljeni od strane lekara)
- Vaginalni uzorci prikupljeni četkicom (samoprikupljeni)

Indikacije za upotrebu:

1. Kao dodatni test za žene s pozitivnim testom na humani papiloma virusa (HPV) kako bi se utvrdila potreba za upućivanjem na kolposkopiju ili druge dodatne postupke.
2. Kao dodatni test za žene sa rezultatima Papa testa sa atipičnim pločastim ćelijama neodređenog značaja (ASC-US) kako bi se utvrdila potreba za upućivanjem na kolposkopiju ili druge dodatne postupke.

Ovaj proizvod je predviđen za korišćenje od strane profesionalnih korisnika, kao što su tehničari i laboranti koji su obučeni za in vitro dijagnostičke procedure, tehnike molekularne biologije i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sistem.

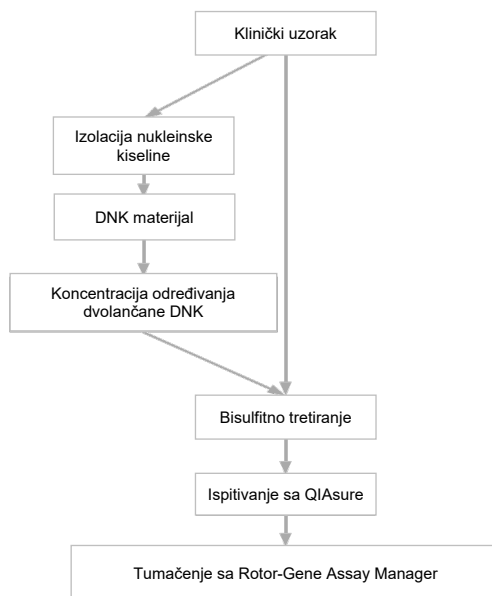
Sažetak i objašnjenje

Metilacija DNK je biohemijski proces koji je važan za normalan razvoj u višim organizmima (1). Uključuje dodavanje metilne grupe na 5. poziciju pirimidinskog prstena citozinskog nukleotida. Nenormalni obrasci metilacije DNK takođe igraju važnu ulogu u karcinogenezi. U nekoliko humanih karcinoma i linijskih ćelija karcinoma, uključujući karcinom grlića materice i karcinom endometrijskog tkiva, detektovana je hipermetilacija promotora gena *FAM19A4* (porodica sa članom A4 sličnosti sekvence 19 (nalik na hemokin (C-C motiv))) i/ili *hsa-mir124-2* (*homo sapiens mikro RNK 124-2*) (2–6). Analiza metilacije promotora ćelija domaćina posebno otkriva karcinome i takozvane „uznapredovale“ cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN) ili lezije, koje sadrže profil metilacije sličnog karcinomu i imaju visok kratkoročan rizik od progresije u karcinom (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). QIASure ispitivanje omogućava detekciju hipermetilacije promotora gena *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* u bisulfitno konvertovanoj DNK koja je izolovana iz cervikalnih ili vaginalnih uzoraka koristeći ACTB (humani β -aktin gen) kao internu kontrolu kvaliteta uzorka.

Principi procedure

QIASure Methylation Test je multipleksno real-time PCR ispitivanje koje pojačava regije metiliranog promotora tumor supresorskih gena *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*, kao i fragment referentnog gena koji nije specifičan za metilaciju. Komplet sadrži 2 epruvete QIASure Master Mix i 2 epruvete QIASure Calibrator. Master miks je namenjen za amplifikaciju bisulfitno konvertovane DNK koja je pripremljena iz kliničkih uzoraka. Master miks sadrži prajmere i probe za ciljane gene i referentni gen, koji služi kao interna kontrola kvaliteta uzorka. Kalibrator je linearizovani plazmid koji sadrži sekvence ampikona *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* i ACTB.

Procedura radnog toka



QIASure ispitivanje se izvršava na instrumentu Rotor-Gene Q MDx, a softver Rotor-Gene AssayManager® automatski vrši analizu i tumačenje podataka. C_T vrednost (granična vrednost ciklusa) predstavlja broj PCR ciklusa potrebnih za detekciju fluorescentnog signala iznad pozadinskog signala, koji je povezan sa brojem ciljnih molekula prisutnih u uzorku. QIASure ispitivanje izračunava ΔC_T vrednost kao razliku između C_T vrednosti ciljeva *FAM19A4* ili *hsa-mir124-2* i C_T vrednosti reference (ACTB). Ova ΔC_T vrednost je relativna kvantitativna vrednost za nivo metilacije promotora gena *FAM19A4* ili *hsa-mir124-2*. Za normalizaciju, ΔC_T vrednost uzorka kalibratora oduzima se od ΔC_T vrednosti ciljeva *FAM19A4* ili *hsa-mir124-2* što rezultira $\Delta\Delta C_T$ vrednošću (9). Kalibrator je standardizovani uzorak plazmidne DNK sa malim brojem kopija sa poznatim brojem kopija tri cilja (tj. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* i ACTB).

Obezbeđeni materijal

Sadržaj kompleta

QIASure Methylation Test		72
Kataloški br.		616014
Broj reakcija		72
QIASure Master Mix (2 epruvete)	Epruveta braon boje	630 µl
QIASure Calibrator (2 epruvete)	Providna epruveta	25 µl
QIASure Methylation Test uputstvo za upotrebu (uputstvo)		1

Potreban materijal koji se ne isporučuje

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim tehničkim specifikacijama (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Potrošni materijal i reagensi za pripremu uzorka za samoprikupljene uzorke

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Reagensi za pripremu uzoraka koji se čuvaju u SurePath medijumu za prikupljanje.

- Buffer AL (QIAGEN kataloški broj: 19075)

Potrošni materijal i reagensi za bisulfitnu konverziju

Verifikovani 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)
- Prečišćena voda (npr. za molekularnu biologiju, destilovana ili dejonizovana)

Oprema

- Podesive pipete* namenjene za PCR (1–10 µl; 10–100 µl)
- Rukavice za jednokratnu upotrebu
- Statička centrifuga* sa brzinom >10.000 rpm
- Vortex mešalica*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, kat. br. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, kat. br. ND-3300) ili ekvivalent
- QIASymphony SP System (kat. br. 9001297) za opcionu automatizovanu ekstrakciju i/ili bisulfitnu konverziju

* Proverite da li su instrumenti provereni i kalibrisani u skladu sa preporukama proizvođača.

Oprema za real-time PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (kat. br. 9002033) ili Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument (kat. br. 9002032)*
- Rotor-Gene AssayManager Core Application softver verzije 1.0.x (gde je x broj veći ili jednak 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in instaliran, verzija 1.0.x (gde je x broj veći ili jednak 1)
- QIASure Assay Profile (iz datoteke AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (gde je Y broj veći ili jednak 1) za primenu na bisulfitno konvertovanoj DNK dobijenoj iz cervikalnih uzoraka prikupljenih od strane lekara
- Profil ispitivanja QIASure samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice (iz datoteke AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (gde je Y broj veći ili jednak 0) se koristi za primenu na bisulfitno konvertovanoj DNK iz samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice

* Rotor-Gene Q 5plex HRM instrument proizveden u januaru 2010. godine ili kasnije. Datum proizvodnje se može pronaći u okviru serijskog broja na poleđini instrumenta. Serijski broj je naveden u obliku „mmggnnn“, gde „mm“ označava mesec proizvodnje u ciframa, „gg“ označava poslednje dve cifre godine proizvodnje, a „nnn“ predstavlja jedinstvenu identifikaciju instrumenta.

Upozorenja i mere opreza

Samo za korišćenje u in vitro dijagnostici.

Informacije o bezbednosti

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate SDS-ove za svaki QIAGEN® komplet i komponentu kompleta.

QIASURE MASTER MIX



Sadrži: 1,2,4-triazol: Opasnost! Sumnja se da može da utiče na plodnost ili na plod. Nosite zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/zaštitu za oči i zaštitu za lice.

Opšte mere opreza

Korišćenje PCR testova zahteva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je namenjena za molekularnu biologiju i koja je u skladu sa važećim propisima i odgovarajućim standardima.

Uvek obratite pažnju na sledeće:

- Nosite zaštitne rukavice bez pudera za jednokratnu upotrebu, laboratorijski mantil i zaštitu za oči prilikom rukovanja uzorcima.

- Sprečite mikrobiološku i kontaminaciju nukleazom (DNazom) uzorka i kompleta. DNaza može uzrokovati degradaciju DNK matrice.
- Izbegavajte prenosnu kontaminaciju DNK ili PCR proizvodom, što može rezultirati lažnim pozitivnim rezultatom.
- Uvek koristite pipetne nastavke bez DNaze za jednokratnu upotrebu sa aerosolnim barijerama.
- Reagensi QIASure ispitivanja su optimalno razblaženi. Nemojte da dodatno razblažujete reagense pošto to može da dovede do smanjenja efikasnosti.
- Svi reagensi u kompletu QIASure namenjeni su za upotrebu isključivo sa drugim reagensima koji se dostavljaju u istom kompletu. Ne zamenjujte nijedan reagens iz jednog kompleta istim reagensom iz drugog kompleta QIASure, čak ni iz iste serije, jer to može uticati na performanse.
- Pročitajte priručnik za upotrebu Rotor-Gene Q MDx instrumenta kako biste se upoznali sa dodatnim upozorenjima, merama opreza i postupcima.
- Pre prve obrade dana, izvršite probnu obradu za Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM na 95 °C na 10 minuta.
- Promena vremena inkubacije i temperature može rezultirati podacima sa greškom ili koji se ne podudaraju.
- Ne koristite komponente kompleta kojima je istekao rok upotrebe ili koji su nepravilno čuvani.
- Izlaganje komponenti svetlosti svedite na minimum; reakcione smeše se mogu izmeniti usled izlaganja.
- Budite izuzetno oprezni kako biste sprečili kontaminaciju smeša sintetičkim materijalima koji se nalaze u PCR reagensima.
- Odlažite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu sa bezbednosnim postupcima koji su važeći u vašoj zemlji.

Mere predostrožnosti u vezi sa AssayManager profilima

Potrebni su različiti AssayManager profili za različite tipove uzoraka. Vodite računa da se koristi ispravan profil za tip uzorka koji se ispituje, kao što je navedeno u nastavku:

- „Profil ispitivanja QIASure cervikalnih strugotina (iz datoteke AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)“ mora se koristiti za ispitivanje bisulfitno konvertovane DNK iz cervikalnih uzoraka prikupljenih od strane lekara
- „Profil ispitivanja QIASure samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice (iz datoteke AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)“ mora se koristiti za ispitivanje bisulfitno konvertovane DNK iz samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice

Čuvanje reagensa i njihovo rukovanje

Uslovi transporta

QIASure Methylation Test se isporučuje na suvom ledu. Ako bilo koja od komponenti QIASure Methylation Test po prispeću nije u zamrznutom stanju, ako se spoljašnje pakovanje otvorilo tokom transporta ili pošiljka ne sadrži otpremnicu, priručnike ili reagense, obratite se odeljenju za tehnička pitanja kompanije QIAGEN ili lokalnom distributeru (pogledajte korice ili posetite veb stranicu www.qiagen.com).

Uslovi čuvanja

QIASure Methylation Test odmah po prispeću mora da se čuvati na temperaturama od -30 do -15 °C, u zamrzivaču sa konstantnom temperaturom i zaštićen od svetlosti.

Stabilnost

Kada se čuva u navedenim uslovima čuvanja, QIASure Methylation Test je stabilan do isteka roka upotrebe naznačenog na nalepnici na kutiji.

Nakon što se otvore, reagensi mogu da se čuvaju u svom originalnom pakovanju na temperaturama od -30 do -15 °C. Ponovljeno odmrzavanje i zamrzavanje treba izbegavati. Ne prekoračujte maksimalnih 3 ciklusa odmrzavanja i zamrzavanja.

- Blago promešajte okretanjem epruvete 10 puta i centrifugirajte sve epruvete pre otvaranja.
- Rok upotrebe za svaki reagens je naznačen na pojedinačnim nalepnicama komponenti. U pravilnim uslovima čuvanja, proizvod će održavati performanse za period stabilnosti sve dok se koriste iste serije komponenti.

Rukovanje uzorcima i njihovo čuvanje

OPREZ



Svi uzorci moraju da se tretiraju kao potencijalno infektivan materijal.

Cervikalni uzorci

Komplet QIASure služi za upotrebu sa uzorcima bisulfitno konvertovane genomske DNK dobijenih iz cervikalnih uzoraka. Odobreni medijumi za prikupljanje cervikalnih uzoraka (strugotine) su medijum za prikupljanje PreservCyt®, medijum za prikupljanje SurePath™ i transportni medijum za uzorke *Digene* Specimen Transport Medium. Optimalna temperatura čuvanja kliničkih uzoraka je 2–8 °C po dospeću u laboratoriju. U ovim uslovima čuvanja, uzorci u medijumu za prikupljanje PreservCyt ili SurePath™ su stabilni 3 meseca pre ekstrakcije DNK.

Napomena: Cervikalni uzorci u transportnom medijumu za uzorke mogu se isporučiti u laboratoriju za testiranje preko noći na 2–30 °C i ponovo zamrznuti na -20 °C po prispeću.

Samoprikupljeni vaginalni uzorci dobijeni pomoću četkice

QIASure Methylation Test služi za upotrebu sa uzorcima bisulfitno konvertovane genomske DNK ekstrahovanih iz samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice. Samoprikupljeni vaginalni uzorci dobijeni pomoću četkice mogu da se prikupljaju i šalju suvi i po dostavi u laboratoriju čuvaju u medijumu za prikupljanje PreservCyt sa preporučenom zapreminom za skladištenje od 2–3 ml. Uzorci u medijumu za prikupljanje PreservCyt se mogu čuvati na temperaturi od 2–8 °C ili na sobnoj temperaturi ne duže od 3 meseca.

Uzorci genomske DNK

Kada se ekstrahuje genomska DNK, uzorci DNK se mogu čuvati i isporučiti na temperaturi od -30 °C do -15 °C do 12 meseci.

Priprema uzorka za uzorke koji se skladište u PreservCyt

QIASure Methylation Test je odobren za upotrebu sa bisulfitno konvertovanom genomskom DNK dobijenom iz cervikalnih uzoraka. Bisulfitna konverzija genomske DNK može da se obavi:

- i) sa prethodnom ekstrakcijom DNK i kontrolom kvaliteta DNK ili
- ii) direktno na cervikalnom uzorku pomoću EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat. br. 59720) ili
- iii) direktno na cervikalnom uzorku pomoću QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN kat. br. 931106).

Naše preporuke su navedene u nastavku.

- i) Bisulfitna konverzija sa prethodnom ekstrakcijom DNK i kontrolom kvaliteta DNK
Ovaj protokol zahteva ekstrakciju DNK, merenje koncentracije DNK, potom alikvotiranje optimalne zapremine eluata pre nego što započne protokol bisulfitne konverzije, i verifikovan je za EZ DNA Methylation™ Kit (kat. br. D5001) i EZ DNA Methylation-Lightning Kit (kat. br. D5030) kompanije ZYMO Research. Preporučujemo sledeće metode:
 - Ekstrahovanje DNK
Standardni kompleti za ekstrakciju DNK (npr. kompleti na bazi kolone i magnetnog mehura) su kompatibilni sa QIASure Methylation Test.
 - Merenje koncentracije DNK
Izmerite koncentraciju DNK pre bisulfitne konverzije DNK. Pogodni sistemi za merenje koncentracija DNK su Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba proizvodi kompanija Thermo Fisher Scientific) ili ekvivalenti.

- Alikvotiranje eluata DNK

Optimalni unos DNK za bisulfitnu konverziju kreće se od 100 ng do 2 µg, a preporučuje se 200 ng za bisulfitnu konverziju. Ako je koncentracija DNK preniska za bisulfitnu konverziju, ponovite ekstrakciju DNK sa većom zapreminom kliničkog uzorka ili isperite DNK u manjoj izdvojenoj zapremini.

- Bisulfitna konverzija pomoću EZ DNA Methylation Kit i EZ DNA Methylation-Lightning Kit vrši se prema preporukama proizvođača.

Napomena: Prema EZ DNA Methylation Kit, maksimalna količina uzorka DNK ne sme biti veća od 2 µg da bi se dobila dovoljno visoka efikasnost konverzije (> 98%).

- ii) Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnom uzorku sa EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit
Bisulfitna konverzija koja se direktno vrši na cervikalnom uzorku prikupljenom u PreservCyt® Solution verifikovana je za EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit proizvođača QIAGEN. Referiramo se na *Priručnik za EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion* za uzorke DNK visoke koncentracije (1 ng–2 µg) prema preporuci proizvođača, osim sledećih stavki:

- Korak 1 protokola. Uzmite 2,5% cervikalnog uzorka u medijumu za prikupljanje PreservCyt® (tj. 500 µl od 20 ml) i napravite kuglicu centrifugiranjem 10 minuta pri minimalno 3390 x g. Odbacite supernatant tako da ostavite ćelijsku kuglicu u maksimalno 20 µl medijuma za prikupljanje PreservCyt. Za reakciju bisulfitne konverzije, koristite ovaj uzorak ćelijske kuglice i nastavite sa korakom 2 protokola proizvođača.

- Buffer BL: Nemojte dodavati RNK nosač.

- Izdvojena zapremina bisulfitno konvertovane DNK je 50 µl Buffer EB za svaki uzorak.

- iii) *Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnom uzorku putem QIASymphony Bisulfite Kit*

Bisulfitna konverzija koja se direktno vrši na cervikalnom uzorku prikupljenom u PreservCyt® Solution verifikovana je za QIAAsymphony Bisulfite komplet proizvođača QIAGEN. Referiramo se na priručnik za QIAAsymphony Bisulfite komplet i testiranje se obavlja prema preporukama proizvođača.

- Uzmite 2,5% cervikalnog uzorka u medijumu za prikupljanje PreservCyt® (tj. 500 µl od 20 ml) i napravite kuglicu centrifugiranjem 10 minuta pri minimalno 3390 x g. Odbacite supernatant tako da ostavite ćelijsku kuglicu u maksimalno 20 µl zaostalog medijuma za prikupljanje PreservCyt.
- Za reakciju bisulfitne konverzije pratite „QIAAsymphony SP protocol sheet – Bisulfite 140_HC_V“ počevši od koraka 2, umesto DNK koristite ćelijsku kuglicu.
- Po završetku reakcije bisulfitne konverzije, pokrenite SP obradu na QIAAsymphony prema koracima navedenim u protokolu „Bisulfite conversion of unmethylated Cytosines in different sample types“ (Bisulfitna konverzija nemetiliranih citozina u različitim tipovima uzoraka) u priručniku za QIAAsymphony Bisulfite Kit. Izdvajanje se obavlja u 40 µl.

Priprema uzoraka za uzorke koji se čuvaju u SurePath™

Uzorci koji se čuvaju u SurePath moraju da se predtretiraju pre ekstrahovanja DNK. QIASure Methylation Test je odobren za upotrebu sa bisulfitno konvertovanom genomskom DNK dobijenom iz cervikalnih uzoraka prema doleavedenoj proceduri.

- Uzmite 2,5% cervikalnog uzorka
- Centrifugirajte 10 minuta na 4000 g, uklonite supernatant, ali ostavite 100 µl SurePath™
- Dodajte 100 µl pufera AL i resuspendujte kuglicu
- Dobro promešajte i inkubirajte 20 minuta na 90 °C
- Hladite 5 minuta na sobnoj temperaturi.
- Obavite ekstrahovanje DNK pomoću QIAamp DNA mini kit (ili ekvivalenta) prema uputstvima proizvođača, izdvojite DNK u 50 µl.
- Izmerite koncentraciju DNK, pogodni sistemi su Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (oba proizvodi kompanija Thermo Fisher Scientific) ili ekvivalenti.
- Za bisulfitnu konverziju se preporučuje 200 ng, ako 200 ng nije dostupno, upotrebite maksimalnu ulaznu količinu. Obavite konverziju sa EZ DNA Methylation Kit ili EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo) prema uputstvima proizvođača. Upotrebite 2,5 µl eluata za QIASure Methylation Test.

Opšte preporuke za bisulfitnu konverziju

Reakcija bisulfitne konverzije treba da se izvodi u posebnom području odvojeno od mesta gde se QIASure Master Mix čuva i raspoređuje, da se izbegne kontaminiranje reagensa.

Za QIASure reakciju koristi se 2,5 µl bisulfitno konvertovane DNK.

Ako je interna kontrola kvaliteta uzorka negativna (tj. ACTB C_T vrednosti su > 26,4), preparat uzorka bisulfitno konvertovane DNK rezultiraće materijalom nedovoljne količine i/ili kvaliteta i biće nevažeći. Izvršite preporučene korake da biste dostigli ACTB C_T vrednost unutar važećeg opsega za sledeće:

- Bisulfitna konverzija sa prethodnom ekstrakcijom DNK i kontrolom količine DNK: Ponovite reakciju bisulfitne konverzije sa većim unosom uzorka DNK i/ili ponovite izolaciju DNK sa većim unosom cervikalnog uzorka
- Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnom uzorku: Ponovite reakciju bisulfitne konverzije sa 10%* cervikalnog uzorka u medijumu za prikupljanje PreservCyt (tj. 2 ml od 20 ml).

Bisulfitno konvertovana DNK može se čuvati do 24 sata na 2–8 °C, do 5 dana na -25 do -15 °C i do 3 meseca ispod -70 °C. Uvek treba izbegavati zamrzavanje i odmrzavanje bisulfitno konvertovane DNK. Ne prekoračujte tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja da bi se održao dovoljan kvalitet.

* Zapremina uzorka za direktnu bisulfitnu konverziju može se povećati kada je stopa uspeha nezadovoljavajuća zbog varijabilnosti uzorkovanja, na primer kao rezultat neadekvatnog uzorkovanja.

Protokol: QIASure Methylation Test PCR u Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentu*

Važne napomene pre početka

- Izdvojite vreme da se upoznate sa instrumentom Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM pre nego što započnete protokol. Pogledajte korisnički priručnik za instrument (kat. br. 9002033 ili 9002032).
- Pre prve obrade dana, izvršite probnu obradu za Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM na 95 °C na 10 minuta.
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 omogućava automatizovano tumačenje PCR rezultata. QIASure komplet mora se izvršiti na Rotor-Gene Q MDx instrumentu pomoću Rotor-Gene AssayManager v1.0. Odvojite vreme da se upoznate sa Rotor-Gene AssayManager v1.0 (kat. br. 9022739) i Epsilon Plug-In i pogledajte korisnički priručnik za oboje.
- Potrebni su različiti Assay Profiles (Profili ispitivanja) Rotor-Gene AssayManager v1.0 za različite tipove uzoraka. Vodite računa da se koristi ispravan profil za tip uzorka koji se ispituje, kao što je navedeno u nastavku:
 - „Profil ispitivanja QIASure cervikalnih strugotina (iz datoteke AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)“ mora se koristiti za ispitivanje bisulfitno konvertovane DNK iz cervikalnih uzoraka prikupljenih od strane lekara

* Rotor-Gene Q 5plex HRM instrument proizveden u januaru 2010. godine ili kasnije. Datum proizvodnje se može pronaći u okviru serijskog broja na poledini instrumenta. Serijski broj je naveden u obliku „mmggnnn“, gde „mm“ označava mesec proizvodnje u ciframa, „gg“ označava poslednje dve cifre godine proizvodnje, a „nnn“ predstavlja jedinstvenu identifikaciju instrumenta.

- „Profil ispitivanja QIASure samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice (iz datoteke AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)“ mora se koristiti za ispitivanje bisulfitno konvertovane DNK iz samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice

Napomena: Može se ispitati samo jedan tip uzorka po eksperimentu. Pojedinačni profili ispitivanja su optimizovani za svaki tip uzorka i ključno je da korisnici izaberu tačan profil ispitivanja kako bi dobili optimalne rezultate za svaki određeni tip uzorka.

Šta je potrebno uraditi pre početka procedure

- Na računaru spojenom na Rotor-Gene Q MDx mora biti instaliran Rotor-Gene AssayManager softver verzije 1.0.x (gde je x broj veći ili jednak 4). Pojednostosti o instalaciji softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application, pogledajte *Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application*.
- QIASure Methylation Test zahteva poseban dodatak, nazvan „Epsilon Plug-in“ (verzija 1.0.1 ili novija). Ovaj dodatak se može preuzeti sa veb stranice kompanije QIAGEN: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Dodatak mora biti instaliran na računaru koji već ima instaliran Rotor-Gene AssayManager verzije 1.0.x (gde je x broj veći ili jednak 4).
- QIASure Methylation Test zahteva određeni profil ispitivanja za korišćenje softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0. Ovaj profil ispitivanja sadrži sve parametre potrebne za cikluse i analizu eksperimenta. Postoje 2 QIASureAssay Profiles:
 - „Profil ispitivanja QIASure cervikalnih strugotina (iz datoteke AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)“ koji se koristi za cervikalne uzorke prikupljene od strane lekara

- „Profil ispitivanja QIASure samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice (iz datoteke AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)“ koji se koristi za samoprikupljene vaginalne uzorke dobijene pomoću četkice. Profili se mogu preuzeti sa veb stranice QIASure Methylation Test: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Profil ispitivanja treba da se uveze u softver Rotor-Gene AssayManager.

Napomena: QIASure komplet se može izvršiti samo ako su programirane određene postavke konfiguracije u Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Za bezbednost procesa na nivou sistema moraju se podesiti sledeće potrebne postavke konfiguracije za zatvoreni režim:

- „Material number required“ (Potreban broj materijala)
- „Valid expiry date required“ (Potreban važeći rok upotrebe)
- „Lot number required“ (Potreban broj serije)

Instalacija Epsilon Plug-in i uvoz profila ispitivanja

Instalacija i uvoz Epsilon Plug-in i profila ispitivanja detaljno su opisani u *Korisničkom priručniku za Rotor-Gene AssayManager Core Application* i *Korisničkom priručniku za Epsilon Plug-In*.

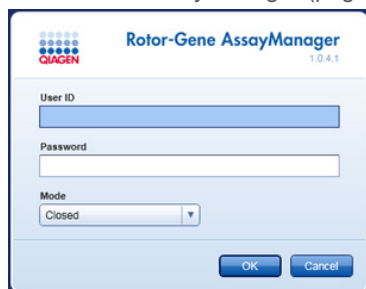
- Preuzmite i Epsilon Plug-in i najnoviju verziju QIASure Assay Profile sa veb stranice kompanije QIAGEN.
- Započnite postupak instalacije dvostrukim klikom na datoteku EpsilonPlugin.Installation.msi i sledite uputstva za instalaciju. Detaljan opis ovog postupka potražite u odeljku „Installing Plug-ins“ u *Korisničkom priručniku za AssayManager Core Application*.

Napomena: Za bezbednost procesa na nivou sistema odaberite karticu Settings (Postavke) i označite okvire Material number required (Potreban broj materijala), Valid expiry date required (Potreban važeći rok upotrebe) i Lot number required (Potreban broj serije) za zatvoreni režim (odeljak Work list (Radna lista)). Ako nisu omogućeni (označeni), kliknite da biste ih omogućili.

- Nakon uspešne instalacije dodatka, osoba sa administratorskim pravima za softver Rotor Gene AssayManager moraće da uveze profil ispitivanja AP_QIASure_V1_0_Y.iap na sledeći način.

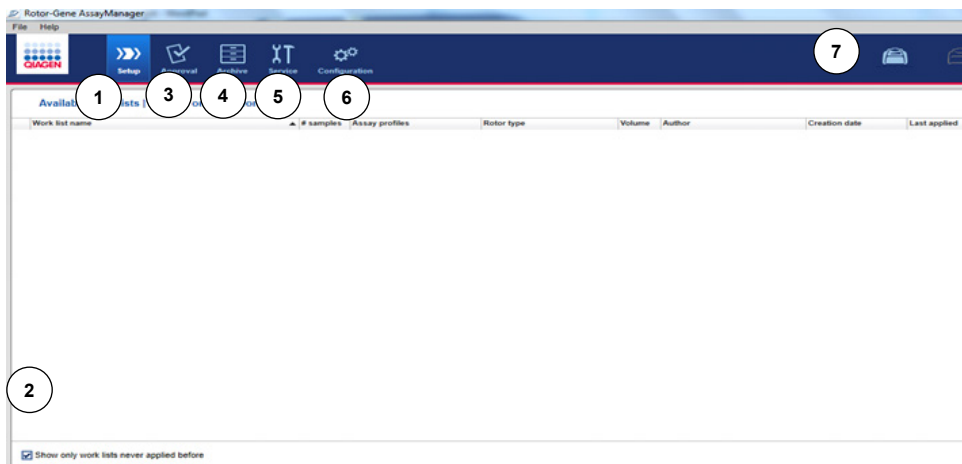


1. Otvorite softver Rotor-Gene AssayManager klikom na ikonu.  Otvara se prozor Rotor-Gene AssayManager (pogledajte Sliku 1).



Slika 1. Ekran za prijavu na Rotor-Gene AssayManager.

2. Prijavite se na Rotor-Gene AssayManager sa korisničkim ID brojem i lozinkom. Nemojte promeniti režim „Closed“ (Zatvoreno). Kliknite na OK (U redu). Otvara se ekran Rotor-Gene Assay Manager (pogledajte ispod).



1 Kartica Set-up (Podešavanje). Ova kartica omogućava upravljanje ili primenu radnih lista.

2 Provera primenjenih radnih lista prikazuje samo nove radne liste.

3 Kartica Approval (Odobrenje). Ova kartica vam omogućava da pronađete prethodne eksperimente (obrade).

4 Kartica Archive (Arhiva). Omogućava vam da pronađete stare eksperimente (obrade) koji su već odobreni.

5 Kartica Service (Servis). Prikazuje izveštaj o tragu revizije svake datoteke generisane softverom.

6 Kartica Configuration (Konfiguracija). Omogućava konfiguraciju svih softverskih parametara.

7 Ikone Rotor-Gene Q MDx.



Nije povezano



Povezano

3. Izaberite okruženje konfiguracije.

4. Izaberite karticu Assay Profiles (Profili ispitivanja).

5. Kliknite na Import (Uvoz).

6. Izaberite profil ispitivanja AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap za cervikalne uzorke i/ili profil ispitivanja AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap za uvoz u dijalog i kliknite na Open (Otvori).

7. Kada se profil ispitivanja uspešno uveze može se koristiti u okruženju „Setup“ (Podešavanje).

Napomena: Ista verzija profila ispitivanja se ne može uvesti dva puta.

Obrada uzoraka na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete

Do 70 uzoraka bisulfitno konvertovane DNK se može testirati u okviru iste obrade (eksperimenta), pored kalibratora i kontrole bez matrice. Šematski prikaz u Tabeli 1 pruža primer držača za epruvete ili podešavanja rotora za obradu sa QIASure Methylation Test. Brojevi označavaju pozicije u držaču za epruvete i krajnju poziciju u rotoru.

Tabela 1. Podešavanje ploče i rotora za obradu sa QIASure kompletom na Rotor-Gene Q MDx instrumentu

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		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 ubaciti u rotor kao što je navedeno u Tabeli 1. Automatizovana analiza podešena u profilu ispitivanja temelji se na ovoj organizaciji. Ako se koristi drugačiji raspored, dobiće se netačni rezultati.

Napomena: Popunite sve neiskorišćene položaje praznim epruvetama.

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

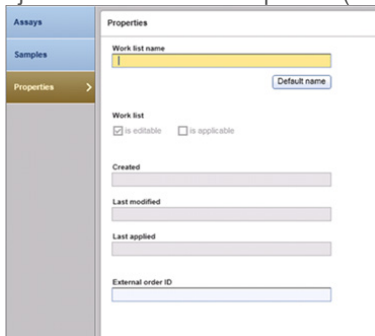
Pre prve obrade dana, izvršite probnu obradu za Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM na 95 °C na 10 minuta.

1. Napravite radnu listu za uzorak koji će biti obrađen na sledeći način:

- 1a. Uključite Rotor-Gene Q MDx instrument.
- 1b. Otvorite softver Rotor-Gene AssayManager i prijavite se kao korisnik s ulogom operatera u zatvorenom režimu.
- 1c. Kliknite na New work list (Nova radna lista) u menadžeru radnih lista (okruženje „Setup“ (Podešavanje)).
- 1d. Izaberite QIASure assay profile (Profil ispitivanja QIASure) sa liste dostupnih profila ispitivanja.
Napomena: Profil ispitivanja AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap koristi se za cervikalne uzorke; profil ispitivanja AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap koristi se za samoprikupljene vaginalne uzorke dobijene pomoću četkice.
Napomena: Može se ispitati samo jedan tip uzorka po eksperimentu.
- 1e. Kliknite na Move (Premesti) za prenos izabranog profila ispitivanja na listu Selected assay profiles (Izabrani profili ispitivanja). Profil ispitivanja sada bi trebao biti prikazan na listi „Selected assay profiles“ (Izabrani profili ispitivanja).
- 1f. Unesite broj uzoraka u odgovarajuće polje.
- 1g. Unesite sledeće informacije o QIASure kompletu koje su odštampane na poklopcu kutije.
 - Broj materijala: 1102417
 - Važeći rok upotrebe koristeći format GGGG-MM-DD
 - Broj serije
- 1h. Izaberite korak Samples (Uzorci). Lista sa detaljima o uzorku biće prikazana na ekranu AssayManager. Ova lista predstavlja očekivani raspored rotora.

1i. Unesite identifikacioni broj ili brojeve uzorka na ovu listu, kao i sve opcione informacije o uzorku kao komentar za svaki uzorak.

1j. Izaberite korak Properties (Svojstva) i unesite naziv radne liste (Slika 2).



Slika 2. Svojstva

1k. Označite polje za potvrdu is applicable (primenljivo) i kliknite na Apply (Primeni).

1l. Sačuvajte radnu listu.

Radna lista može da se odštampa, što može pomoći u pripremi i podešavanju PCR-a. Da biste odštampali radnu listu, kliknite na Print work list (Odštampaj radnu listu). Detalji o uzorku su uključeni kao deo ove radne liste.

Napomena: Radna lista se može kreirati nakon što je obrada podešena na instrumentu, ili se radna lista može sačuvati pre dodavanja uzoraka u instrument.

2. Podesite QIASure obradu.

Da bi se umanjio rizik od kontaminacije PCR reakcije, strogo se preporučuje da koristite PCR ormar sa mogućnošću UV zračenja.

Raspoređivanje QIASure Master Mix se mora obaviti u oblasti odvojenoj od one u kojoj se obavlja reakcija bisulfitne konverzije DNK.

Očistite oblast stola, pipete i držač za epruvete pre korišćenja sa rastvorom za razgradnju DNK kako bi se sprečila kontaminacija matrice ili nukleaze.

Napomena: Menjajte nastavke za svaku epruvetu da biste izbegli bilo kakvu nespecifičnu kontaminaciju matrice ili smeše reagenasa što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

2a. Odmrznite QIASure Master Mix i QIASure Calibrator u potpunosti i zaštitite QIASure Master Mix od svetlosti, kad god je to moguće.

Napomena: Ne prekoračujte 30 minuta za korak odmrzavanja da biste izbegli degradaciju materijala.

2b. Lagano promešajte okretanjem 10 puta, zatim kratko centrifugirajte pre upotrebe.

2c. U odgovarajuće trake sa epruvetama rasporedite 17,5 µl QIASure Master Mix spremnog za upotrebu. Postavljanje reakcije se može obaviti na sobnoj temperaturi.

2d. Vratite QIASure Master Mix u zamrzivač da biste izbegli degradaciju materijala.

2e. Prenesite epruvete u odvojenu oblast da biste rasporedili kontrole ispitivanja i bisulfitno konvertovane uzorke.

2f. Dodajte 2,5 µl vode u kontrolu bez matrice (No Template Control, NTC) na položaju 2 (pogledajte Tabelu 1 gore). Lagano promešajte pipetiranjem gore i dole.

2g. Dodajte 2,5 µl QIASure Calibrator na položaju 1 (pogledajte Tabelu 1 gore). Lagano promešajte pipetiranjem gore i dole i zatvorite epruvetu poklopcem.

2h. Dodajte 2,5 µl bisulfitno konvertovane DNK u odgovarajuću epruvetu. Lagano promešajte pipetiranjem gore i dole.

2i. Kada se postavljene 4 epruvete napune, zatvorite ih poklopcem.

Napomena: PCR epruvete se mogu čuvati 30 minuta između pipetiranja uzoraka u PCR i početka eksperimenta u uređaju na temperaturi od 2-8°C na tamnom.

2j. Vratite QIASure Calibrator u zamrzivač da biste izbegli degradaciju materijala.

Napomena: Menjajte nastavke za svaku epruvetu da biste izbegli bilo kakvu nespecifičnu kontaminaciju matrice ili smeše reagenasa što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

3. Pripremite Rotor-Gene Q MDx i počnite obradu (eksperiment) na sledeći način:

3a. Postavite rotor sa 72 bunarčića na držač rotora.

- 3b. Napunite rotor trakama sa epruvetama u skladu sa dodeljenim položajima, počevši od položaja 1, kao što je prikazano u Tabelu 1, sa trakama sa praznim epruvetama sa poklopcem na svim neiskorišćenim položajima.

Napomena: Vodite računa da prva epruveta bude umetnuta na položaj 1 i da trake sa epruvetama budu postavljene na pravilnu orijentaciju i položaje kao što je prikazano u Tabeli 1.

- 3c. Pričvrstite prsten za zaključavanje.
- 3d. Postavite rotor i prsten za zaključavanje u Rotor-Gene Q MDx instrument i zatvorite poklopac instrumenta.
- 3e. U okviru softvera Rotor-Gene AssayManager v1.0, izaberite odgovarajuću radnu listu iz menadžera radnih lista i kliknite na Apply (Primeni) ili ako je radna lista još uvek otvorena, kliknite na Apply (Primeni).

Napomena: Ako radna lista za obradu nije kreirana, prijavite se na Rotor-Gene AssayManager v1.0 i pratite korak 1 pre nastavka.

- 3f. Unesite naziv obrade (eksperimenta).
- 3g. Izaberite ciklusni uređaj koji će se koristiti na listi Cycler selection (Izbor ciklusnog uređaja).
- 3h. Proverite da li je prsten za zaključavanje ispravno pričvršćen i potvrdite da je pričvršćen na ekranu.
- 3i. Kliknite na Start experiment (Pokreni eksperiment).
Obrada QIASure Methylation Test treba da započne.

4. Nakon završetka obrade, kliknite na Finish run (Završi obradu).

5. Objavite i odobrite obradu.

- Za korisnike prijavljene sa ulogom Approver (Davalac odobrenja), kliknite na Release and go to approval (Objavi i idi na odobrenje).
- Za korisnike prijavljene sa ulogom Operator (Operator), kliknite na Release (Objavi).

6. Objavite rezultate.

- Ako ste kliknuli na Release and go to approval (Objavi i idi na odobrenje), prikazaće se rezultati za eksperiment.
- Ako je korisnik sa korisničkom ulogom kliknuo na Release (Objavi), neko sa ulogom „Approver“ (Davalac odobrenja) će morati da se prijavi i izabere okruženje „Approval“ (Odobrenje).
- Filtrirajte ispitivanje koje treba odobriti tako da izaberete opcije za filtriranje i kliknete na Apply (Primeni).
- Pregledajte rezultate i odobrite rezultate svakog testnog uzorka.

U tabeli „Results“ (Rezultati) listajte do uzorka koji treba odobriti. Svaki rezultat uzorka koji treba odobriti ima tri dugmeta za izbor na kraju određenog reda.

Odaberite accept (prihvati) ili reject (odbaci) za rezultat uzorka.

Napomena: Rezultat koji je automatski podešen na INVALID (NEVAŽEĆE) od strane Rotor-Gene AssayManager se više ne može konvertovati u važeći rezultat, čak i ako je rezultat odbačen.

Opciono: Unesite komentar u kolonu Sample comment (Komentar uzorka).

- Kliknite na Release/Report data (Objavi/izdaj podatke).
- Kliknite na OK (U redu). Izveštaj će se generisati u formatu Adobe Portable Document (.pdf) i automatski se čuva u unapred definisanom folderu. Podrazumevano, putanja ovog foldera je: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Izvoz) > Reports (Izveštaji)

Napomena: Ova putanja i folder se mogu menjati u okruženju „Configuration“ (Konfiguracija).

- Idite na karticu Archive (Arhiva) za izvoz .rex datoteke, koja odgovara neobrađenim podacima. Pronađite željeni eksperiment pomoću opcija za filtriranje i kliknite na show assays (prikaži ispitivanja). Zatim kliknite na Export .rex file (Izvoz .rex datoteke) i sačuvajte je klikom na OK (U redu). Softver automatski čuva .rex datoteku u sledećem unapred definisanom folderu: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Izvoz) > Experiments** (Eksperimenti)

Napomena: Ova putanja i folder se mogu menjati na kartici Specify the .rex file export destination (Odredi odredište izvoza .rex datoteke).

Napomena: Za rešavanje problema potreban je paket podrške za obradu. Paketi podrške mogu se generisati iz okruženja za odobrenje ili arhivu. Pogledajte *Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager Core Application*, Troubleshooting, „Creating a support package“ na lokaciji <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Pored toga, trag revizije iz vremena incidenta ± 1 dan može biti koristan. Trag revizije može se pronaći u okruženju Service (Servis) (*Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Ispraznite Rotor-Gene Q MDx instrument i odložite trake sa epruvetama u skladu sa lokalnim bezbednosnim propisima.

Tumačenje rezultata

Analiza je u potpunosti automatizovana.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 prvo analizira krive amplifikacije i može poništiti neusklađene krive, zavisno od njihovog oblika i amplitude šuma. U ovom slučaju, nevažeća kriva imaće oznaku (pogledajte Tabelu 2).

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

- Kalibrator
- NTC

Napomena: Izveštaj generisan na kraju obrade prikazuje rezultate dobijene na kontrolama sa nevažećim oznakama ispred nevažećih podataka.

Ako su sve kontrole u toku obrade usklađene, tada će Rotor-Gene AssayManager analizirati nepoznate uzorke.

Tabela 2 prikazuje oznake nevažećih uzoraka koje se mogu dodeliti pojedinačnoj epruveti tokom analize od strane Rotor-Gene AssayManager v1.0, zajedno sa objašnjenjem značenja ove oznake.

Tabela 2. Oznake nevažećih uzoraka i opis pojmova

Oznaka	Ponašanje	Opis
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Nevažeće)	Ciljna vrednost je viša od definisanog opsega. Ovo može biti C _T , fluorescencija parametra praćenja, koncentracija ili izračunata vrednost, npr. srednja vrednost C _T ili ΔC _T .
ASSAY_INVALID	Invalid (Nevažeće)	Ispitivanje je nevažeće jer je najmanje jedna spoljašnja kontrola nevažeća.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Nevažeće)	Ciljna vrednost je niža od definisanog opsega. Ovo može biti C _T , fluorescencija parametra praćenja, koncentracija ili izračunata vrednost, npr. srednja vrednost C _T ili ΔC _T .
CONSECUTIVE_FAULT	Invalid (Nevažeće)	Cilj koji je korišćen za izračunavanje ovog cilja je nevažeći.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Invalid (Nevažeće)	Kriva amplifikacije neobrađenih podataka prikazuje oblik koji odstupa od utvrđenog ponašanja za ovo ispitivanje. Postoji velika verovatnoća od pogrešnih rezultata ili pogrešnog tumačenja rezultata.
FLAT_BUMP	Invalid (Nevažeće)	Kriva amplifikacije neobrađenih podataka prikazuje oblik ravne izbočine koji odstupa od utvrđenog ponašanja za ovo ispitivanje. Postoji velika verovatnoća od pogrešnih rezultata ili pogrešnog tumačenja rezultata (npr. pogrešno određivanje CT vrednosti).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Važeće)	NTC pokazuje C _T vrednosti signala iznad 36 za ciljni ACTB.
INVALID_CALCULATION	Invalid (Nevažeće)	Izračunavanje za ovaj cilj je neuspešno.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Invalid (Nevažeće)	Kriva amplifikacije prelazi graničnu vrednost više od jednom. Nije moguće odrediti nedvosmisleno C _T vrednost.
NO_BASELINE	Invalid (Nevažeće)	Nije pronađena početna vrednost za inicijalnu osnovnu vrednost.
NO_CT_DETECTED	Variable (Promenljivo)	C _T vrednost nije otkrivena za ovaj cilj.
NO_VALUE	Invalid (Nevažeće)	Cilj nema vrednost, ali očekuje se da će je imati. Ova vrednost ne mora da bude u određenom opsegu. Ovo može biti C _T , fluorescencija parametra praćenja, koncentracija ili izračunata vrednost (npr. srednja vrednost C _T ili ΔC _T).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Warning (Upozorenje)	Odstupanje tokom procedure normalizacije. Kriva amplifikacije prikazuje se sa podrazumevanom normalizacijom; potrebno je ručno proveriti ispravnost rezultata.

Tabela 2. Oznake nevažećih uzoraka i opis pojmova

OTHER_TARGET_INVALID	Invalid (Nevažeće)	Još jedan cilj za isti uzorak je nevažeći.
SATURATION	Invalid (Nevažeće)	Fluorescencija neobrađenih podataka snažno se zasićuje pre prevojne tačke krive amplifikacije.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warning (Upozorenje)	Fluorescencija neobrađenih podataka se zasićuje u fazi platoa krive amplifikacije.
SPIKE	Warning (Upozorenje)	Nagli porast fluorescencije neobrađenih podataka otkriven je u krivoj amplifikacije, ali izvan regiona u kojem je C_T vrednost određena.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Invalid (Nevažeće)	Nagli porast je otkriven u krivoj amplifikacije u blizini C_T vrednosti.
STEEP_BASELINE	Invalid (Nevažeće)	U krivoj amplifikacije otkrivena je strmo rastuća osnovna vrednost za fluorescenciju neobrađenih podataka.
STRONG_BASELINE_DIP	Invalid (Nevažeće)	U krivoj amplifikacije otkrivena je nagli pad osnovne vrednosti za fluorescenciju neobrađenih podataka.
STRONG_NOISE	Invalid (Nevažeće)	Otkriven je snažan šum izvan faze rasta krive amplifikacije.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Invalid (Nevažeće)	Otkriven je snažan šum u (eksponencijalnoj) fazi rasta krive amplifikacije.
UNCERTAIN	Variable (Promenljivo)	Rezultati iz AUDAS u suprotnosti su sa rezultatima osnovne analize. Nedvosmislena automatska procena valjanosti podataka nije moguća.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable (Promenljivo)	C_T vrednost je detektovana za cilj koji se ne treba pojačati.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Nevažeće)	Cilj ima vrednost, ali nije očekivana vrednost. Ovo može biti C_T , fluorescencija parametra praćenja, koncentracija ili izračunata vrednost, npr. srednja vrednost C_T ili ΔC_T .
UPSTREAM	Variable (Promenljivo)	Status uzorka podešen je na Invalid (Nevažeće) ili Unclear (Nejasno) nadređenim procesom (npr. QIAsymphony). Napomena: Za uzorke koji su označeni kao nejasni, ponašanje Rotor-Gene AssayManager je definisano u okruženju „Configuration“ (Konfiguracija) softvera AssayManager. Oznake „Invalid“ (Nevažeće) iz nadređenih procesa uvek rezultiraju nevažećim odgovarajućim uzorkom u Rotor-Gene AssayManager.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Invalid (Nevažeće)	U krivoj amplifikacije otkrivena je talasasta osnovna vrednost za fluorescenciju neobrađenih podataka.

- Ako su sve kontrole uobradi važeće, tada će Rotor-Gene AssayManager v1.0 analizirati nepoznate uzorke. U uzorku mora biti prisutna minimalna količina bisulfitno konvertovane DNK da bi se rezultati mogli tumačiti. Na ovo ukazuje C_T vrednost referentnog gena ACTB, koja mora biti $\leq 26,4$ da bi Rotor-Gene AssayManager potvrdio uzorak.
- Zatim će se izračunati $\Delta\Delta C_T$ vrednosti za *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* i rezultat će se izdati. Ako je $\Delta\Delta C_T$ vrednost ispod granične vrednosti, cilj se ocenjuje kao „Hypermethylation positive“ (Pozitivno na hipermetilaciju).
Napomena: Delimični ili niski nivoi metilacije su prirodna pojava koja za razliku od nivoa hipermetilacije nije direktno povezana sa razvojem karcinoma.
- Smatra se da je uzorak „Hypermethylation positive“ (Pozitivno na hipermetilaciju) kada se najmanje jedan od ciljeva oceni kao „Hypermethylation positive“ (Pozitivno na hipermetilaciju).
- Uzorci sa niskim kvalitetom/kvantitetom DNK (tj. ACTB C_T vrednosti jedva unutar kriterijuma prihvatljivosti; C_T vrednosti od 25 do 26,4) mogu se oceniti kao lažno negativni. Preporučuje se da ponovite pojedinačno ispitivanje PCR. Negativni rezultat ponovljenog testa znači da je uzorak negativan na hipermetilaciju, a pozitivan rezultat znači da je uzorak pozitivan na hipermetilaciju.
- Kod uzoraka sa visokom celularnošću koji se obrađuju sa direktnim protokolom konverzije postoji rizik od preopterećenja PCR reakcije sa DNK, što može da dovede do lažno negativnog rezultata za cilj FAM19A4. Stoga, se za uzorke sa 1) negativnim rezultatom hipermetilacije, 2) vrednošću ACTB $C_T \leq 23$ i 3) vrednošću FAM19A4 $\Delta\Delta C_T$ od 10,36 do 11,36 preporučuje ponavljanje PCR-a sa 5 puta manjim unosom konvertovane DNK razblaživanjem uzorka u vodi.

Vodič za rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može da bude koristan pri rešavanju svih problema do kojih može doći. Dodatne informacije potražite i na strani „Frequently Asked Questions“ (Često postavljana pitanja) našeg Centra za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naučnici tehničke službe kompanije QIAGEN uvek sa zadovoljstvom odgovaraju na svako pitanje koje možda imate u vezi sa informacijama i protokolima iz ovog priručnika ili tehnologijama uzorkovanja i ispitivanja (za podatke o kontaktu pogledajte koricu ili posetite veb-stranicu www.qiagen.com).

Za informacije o rešavanju problema sa Rotor-Gene AssayManager, pogledajte *Korisnički priručnik za Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Komentari i sugestije

Opšte rukovanje

Koncentracija uzorka DNK je preniska za bisulfitnu konverziju

Proverite ekstrakciju DNK

Ponovite ekstrakciju DNK sa kliničkim uzorkom veće koncentracije

Uzorak je označen kao nevažeći: amplifikacija ACTB je previše slaba ili je nema

a) Greška pri pipetiranju ili izostavljeni reagensi

Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite PCR obradu.

b) Proverite koncentrat DNK

Povećajte unos DNK za bisulfitnu konverziju na maksimum. Reakcije bisulfitne konverzije ima optimalne performanse za unos DNK u opsegu između 100 ng–2 µg.

c) Za protokol „Bisulfite-conversion directly on cervical specimen“ (Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnom uzorku), proverite klinički uzorak radi celularnosti

Ponovite reakciju bisulfitne konverzije sa 10% cervikalnog uzorka u medijumu za prikupljanje PreservCyt (tj. 2 ml od 20 ml).

d) Proverite bisulfitno konvertovan eluat

Ponovite bisulfitnu konverziju, moguće je koristiti veći unos DNK po potrebi.

Uzorak je ocenjen kao nevažeći: ciljevi FAM19A4 i/ili hsa-mir124-2 su nevažeći

Nedovoljno mešanje

Promešajte uzorak i reakcionu smešu pipetiranjem (oko 10 puta po epruveti). Ponovite uzorak.

Komentari i sugestije

Pozitivna kontrola je označena kao nevažeća: amplifikacija je previše slaba ili je nema za jednu ili više ciljeva

a) Greška pri pipetiranju ili izostavljeni reagensi	Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite PCR obradu.
b) Delimična degradacija	Sadržaj kompleta čuvajte na temperaturi od -30 do -15°C. Izbegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje do maksimalno tri ciklusa.
c) PCR reagensi delimično razgrađeni	Čuvajte sadržaj kompleta na temperaturi od -30 do -15°C i čuvajte reakcione smeše zaštićene od svetlosti. Izbegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje.
d) Inverzija trake sa epruvetama	Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije.
e) Rok upotrebe	Proverite rok upotrebe korišćenog kompleta.
f) Vremensko odlaganje između pipetiranja uzoraka i početka obrade	PCR reakcione smeše mogu da se čuvaju na 2–8 °C tokom 30 minuta u mraku između razlivanja uzoraka u PCR reakcije i početka obrade u uređaju.

Kontrola bez matice (No Template Control, NTC) nije nevažeća

a) Greška pri pipetiranju	Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite PCR obradu.
b) Unakrsna kontaminacija	Zamenite sve kritične reagense. Uvek rukujte uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalom u skladu sa opšteprihvaćenom praksom da biste sprečili prenosnu kontaminaciju.
c) Kontaminirani reagens	Zamenite sve kritične reagense. Uvek rukujte uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalom u skladu sa opšteprihvaćenom praksom da biste sprečili prenosnu kontaminaciju.
d) Inverzija trake sa epruvetama	Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije.
e) Vremensko odlaganje između pipetiranja uzoraka i početka obrade	PCR reakcione smeše mogu da se čuvaju na 2–8 °C tokom 30 minuta u mraku između razlivanja uzoraka u PCR reakcije i početka obrade u uređaju.
f) Degradacija probe	Reakcione smeše čuvajte zaštićene od svetlosti. Proverite da li ima lažno pozitivnog rezultata na krivoj fluorescencije.

Odsutni ili slabi signali u uzorku, ali je obrada kontrole u redu

a) Inhibitorni efekti	Uvek proverite da na filteru nema ostataka pufera nakon centrifugiranja tokom bisulfitne konverzije. Ponovite bisulfitnu konverziju.
b) Greška pri pipetiranju	Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite PCR obradu.

Ako se problem nastavi, kontaktirajte tehnički servis kompanije QIAGEN.

Ograničenja

QIASure Methylation Test reagensi se isključivo mogu koristiti za in vitro dijagnostiku.

Korišćenje PCR testova zahteva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je namenjena za molekularnu biologiju i koja je u skladu sa važećim propisima i odgovarajućim standardima.

Dostavljeni reagensi i uputstva u ovom kompletu su potvrđeni za optimalne performanse.

QIASure Methylation Test je predviđen za korišćenje od strane laboratorijskih profesionalaca obučениh za korišćenje Rotor-Gene Q MDx instrumenata i Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Proizvod je predviđen samo za korišćenje od strane osoblja koje je dobilo uputstva i koje je obučeno za real-time PCR tehnike i in vitro dijagnostičke procedure. Svi generisani dijagnostički rezultati se moraju tumačiti zajedno za drugim kliničkim ili laboratorijskim nalazima.

Strogo postupanje u skladu sa korisničkim priručnikom (uputstvom) je potrebno za optimalne PCR rezultate.

Obratite pažnju na rokove trajanja koji su odštampani na kutiji i nalepnicama svih komponenti. Ne koristite komponente isteklog roka.

Uzorci sa niskim kvalitetom/kvantitetom DNK (tj. ACTB C_T vrednosti jedva unutar kriterijuma prihvatljivosti; C_T vrednosti od 25 do 26,4) mogu se oceniti kao lažno negativni. Preporučuje se da ponovite pojedinačno ispitivanje. Negativni rezultat ponovljenog testa znači da je uzorak negativan na hipermetilaciju, a pozitivni rezultat znači da je uzorak pozitivan na hipermetilaciju.

Svi reagensi u QIASure Methylation Test namenjeni su za upotrebu isključivo sa drugim reagensima koji se dostavljaju u istom kompletu. Ovo u suprotnom može uticati na performanse.

QIASure Methylation Test je potvrđen za žene pozitivne na HPV.

QIASure Methylation Test je potvrđen za cervikalne uzorke koji su prikupljeni i koji se čuvaju u medijumu PreservCyt, SurePath™ ili STM i za samoprikupljene vaginalne uzorke dobijene pomoću četkice koji se čuvaju u PreservCyt po dostavi u laboratoriju.

Samo je Rotor-Gene Q MDx potvrđen za upotrebu sa QIASure Methylation Test PCR ispitivanjem.

Svaka nepredviđena upotreba ovog proizvoda i/ili izmena komponenti poništava pouzdanost Self-screen B.V.

Odgovornost korisnika je potvrdi performanse sistema za sve procedure koje se koriste u njegovoj laboratoriji, a koje nisu pokriven studijama performansi Self-screen.

Karakteristike učinka

Ograničenje detekcije (LOD)

Analitička senzitivnost QIASure Methylation Test određena je kao ograničenje detekcije od 95% (95% LOD) upotrebom serijskog razblaživanja plazmida koji sadrži sve tri sekvence amplikona (tj. *ACTB*, *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*; opseg 750.000 do 0,25 kopija po PCR). 95% LOD za ciljeve ocenjen je kao najniže razblaženje plazmida koje daje najmanje 35 od 36 pozitivnih rezultata ($C_T < 40$). Ukupno je izvršeno 12 eksperimenata od strane četiri različita operatera (1 obrada po operateru dnevno) koristeći tri različite serije i tri različita RGQ sistema. Svaki eksperiment je uključivao ispitivanje 11 razblaženja plazmida u tri primerka. 95% LOD je za sva tri različita cilja bio 7,5 kopija po PCR-u.

Linearnost

Linearnost QIASure ispitivanja određena je s podacima iz 12 eksperimenata koji su izvršeni za procenu 95% LOD. Dva cilja, *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*, i referentni *ACTB* imaju linearnu amplifikaciju od 750.000 do 7,5 kopija po PCR-u.

Preciznost

Preciznost QIASure Methylation Test određena je kao varijabilnost unutar ispitivanja (varijabilnost višestrukih rezultata uzoraka s istom koncentracijom u okviru jednog eksperimenta) i ukupno neslaganje ispitivanja (varijabilnost višestrukih rezultata ispitivanja generisanih od strane različitih operatera, na različitim instrumentima, sa različitim serijama, u različitim laboratorijama). Ispitivanje je izvršeno na bisulfitno konvertovanoj DNK dobijenom iz cervikalnog uzorka pozitivnog na visokorizični HPV koji je bio pozitivan na hipermetilaciju sa signalima za *FAM19A4* i *hsa-mir124-2*, što odgovara približno 3 puta većoj koncentraciji LOD. Ispitivanje je izvedeno u dva primerka u 8 obrada od strane četiri različita operatera (jedna obrada po operateru dnevno) koristeći dve različite serije i tri različite RGQ mašine u dve različite laboratorije, čime je dobijeno 16 tačaka podataka po uzorku. Koeficijent varijacije (coefficient of variation, CV) je određen za C_T i $\Delta\Delta C_T$ vrednost (Tabela 3).

Tabela 3. CV% CT i ΔΔCT vrednosti u cervikalnom uzorku pozitivnom na metilaciju

	Tip uzorka	Tip uzorka (%)	Tip uzorka (%)
Vrednost CT	Interna kontrola kvaliteta uzorka (npr. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
Vrednost ΔΔCT	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Ukupna statistička disperzija C_T vrednosti uzorka sa pomenutom koncentracijom iznosi 1,32% za internu kontrolu kvaliteta uzorka (ACTB), 1,52% za *FAM19A4* i 1,64% za *hsa-mir124-2*. Ukupna statistička disperzija $\Delta\Delta C_T$ vrednosti uzorka sa pomenutom koncentracijom iznosi 5,97% za *FAM19A4* i 5,75% za *hsa-mir124-2*.

Ometajuće supstance

Ometajuće supstance koje su odabrane zbog njihovog potencijalnog učinka na PCR bile su pufer za desulfonaciju i ispiranje iz kompleta za bisulfitnu konverziju. Supstance koje su potencijalno prisutne u originalnom uzorku nisu ispitivane s obzirom na činjenicu da je uzorak DNK dva puta prečišćen silikagelom, tj. ekstrakcija DNK iz originalnog uzorka i čišćenje DNK nakon bisulfitne konverzije. Tragovi pufera za desulfonaciju i ispiranje pokazali su interferencije u PCR, što je otkriveno nevažecim rezultatom testa za internu kontrolu kvaliteta uzorka.

Klinički učinak

Cervikalni uzorci pozitivni na HPV*

Klinički učinak QIASure Methylation Test za cervikalnu intraepitelnu neoplaziju stepena 3 (CIN 3) i karcinom grlića materice (tj. CIN 3+) je procenjen u okviru EU-multicentrične, retrospektivne studije (13). QIASure Methylation Test je procenjen na 2384 HPV-pozitivna cervikalna skrining uzorka žena (starosti 29–76 godina) izvedena iz četiri zemlje EU (Škotska, Slovenija, Danska, Holandija)(13). Primerci su prikupljeni u medijumu PreservCyt ili SurePath. Studijska populacija je obuhvatala 2012 žena bez dokaza o bolesti u na kontrolnom pregledu u okviru od 2 godine (skraćeno kao $\leq$ CIN 1), 124 sa CIN 2, 228 sa CIN 3 i 20 sa karcinomom. DNK je ekstrahovana iz cervikalnih uzoraka, a 250 ng DNK je korišćeno za unos u reakciju bisulfitne konverzije (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Od 250 ng modifikovane DNK, 20% je korišćeno u PCR (što odgovara 50 ng originalne ciljne DNK/PCR). Ukupne stope pozitivnih rezultata za stope pozitivnih rezultata QIASure Methylation Test stratifikovane po kliničkom parametru praćenja prikazane su u nastavku (Tabela 4).

Tabela 4. Stope pozitivnih rezultata QIASure Methylation Test

Klinički parametar praćenja	Frakcija	Stopa pozitivnih rezultata (95% CI)
$\leq$ CIN 1	437/2012	21,7% (20–23,6)
CIN 2	58/124	46,8% (38,1–56,6)
CIN 3	176/228	77,2% (71,3–82,2)
Karcinom grlića materice	19/20	95,0% (70,7-99,3)

Među cervikalnim uzorcima pozitivnim na visokorizični HPV, senzitivnost za CIN 3+ je 78,6% (195/248; 95% CI: 73,1–88,3) i ukupna specifičnost za QIASure Methylation Test iznosila je 78,3% (n = 2013; 95% CI: 76-80). Negativna prediktivna vrednost pozitivnog ishoda na hrHPV i negativnog ishoda na metilaciju iznosila je 99,9% za karcinom grlića materice (N = 1694; 95% CI: 99,6–99,99), 96,9% za CIN3+ (95% CI: 96–98) i 93,0% za CIN2+ (95% CI: 92–94).

* Cervikalni uzorci prikupljeni od strane lekara.

Osim toga, osetljivost za karcinom grlića materice procenjavana je putem multicentrične svetske retrospektivne studije na 519 invazivnih karcinoma sa različim histotipovima iz preko 25 zemalja (11). DNK je ekstrahovana iz cervikalnih uzoraka, a 250 ng DNK je korišćeno za unos u reakciju bisulfitne konverzije (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Od 250 ng modifikovane DNK, 20% je korišćeno u PCR (što odgovara 50 ng originalne ciljne DNK/PCR). Za 510 od 519 karcinoma je utvrđen pozitivan rezultat sa QIASure Methylation Test, što predstavlja stopu pozitivnosti od 98,3% (95% CI: 96,7–99,2), stope pozitivnosti stratifikovane po histotipu navedene su u nastavku, Tabela 5. Stope pozitivnih rezultata QIASure Methylation Test kod uzoraka karcinoma grlića materice.

Tabela 5. Stope pozitivnih rezultata QIASure Methylation Test kod uzoraka karcinoma grlića materice

Klinički parametar praćenja	Frakcija	Stopa pozitivnih rezultata (95% CI)
Karcinom pločastih ćelija	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)
Retki histotipovi karcinoma	30/32	93,8% (79,2–99,2)
Neodređeni histotip karcinoma	4/4	100% (39,8–100,0)

HPV pozitivni samoprikupljeni vaginalni uzorci dobijeni pomoću četkice

Klinički učinak QIASure Methylation Test za samoprikupljene vaginalne uzorke dobijene pomoću četkice za otkrivanje cervikalne intraepitelne neoplazije stepena 3 i karcinoma grlića materice (tj. CIN 3+) je procenjen ispitivanjem 247 vaginalnih uzoraka pozitivnih na visokorizični HPV. Za 14 uzoraka (5,7%), ACTB C_T vrednosti su bile > 26,4 i prema tome su ocenjeni kao nevažeći. Uzorci sa važećim rezultatima testa obuhvatali su 148 samoprikupljenih uzoraka dobijenih pomoću četkice žena sa ≤ CIN 1 nakon 18 meseci praćenja, 24 sa CIN 2, 50 sa CIN 3, 8 sa karcinomom pločastih ćelija i 3 sa adenokarcinomom. DNK je ekstrahovana iz vaginalnih uzoraka, a 250 ng DNK je korišćeno za unos u reakciju bisulfitne konverzije (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Od 250 ng bisulfitno konvertovane DNK, 20% je korišćeno u PCR (što odgovara 50 ng originalne ciljne DNK/PCR). Stope pozitivnih rezultata QIASure Methylation Test stratifikovane po kliničkom parametru praćenja prikazane su u nastavku (Tabela 6).

Tabela 6. Stope pozitivnih rezultata QIASure Methylation Test kod samoprikupljenih vaginalnih uzoraka dobijenih pomoću četkice

Klinički parametar praćenja	Frakcija	Stopa pozitivnih rezultata (95% CI)
≤CIN 1	34/148	23,0% (16,9–30,4)
CIN 2	7/24	29,2% (14,6–49,8)
CIN 3	33/50	66,0% (52,0–77,7)
Karcinom pločastih ćelija	8/8	100,0% (63,1–100,0)
Adenokarcinom	3/3	100,0% (29,2–100,0)

Među samoprikupljenim vaginalnim uzorcima dobijenim pomoću četkice pozitivnim na visokorizični HPV, senzitivnost za CIN 3+ je 72,1% (44/61; 95% CI: 59,7–81,9), a za karcinom je 100% (11/11; 95% CI: 72–100).*

Učinak *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* za otkrivanje uznapredovalih transformirajućih CIN lezija

Analiza metilacije promotora ćelija domaćina posebno otkriva takozvane „uznapredovale“ cervikalne intraepitelne CIN lezije koje sadrže profil metilacije sličnog karcinomu i imaju očekivan visok kratkoročan rizik od progresije u karcinom (7, 8). Učinak analize hipermetilacije promotora *FAM19A4* i *hsa-mir124-2* procenjen je ispitivanjem 29 uzoraka žena pozitivnih na visokorizični HPV sa uznapredovalim transformirajućim CIN 2/3 i 19 uzoraka žena pozitivnih na visokorizični HPV sa ranim transformirajućim CIN 2/3. Metilacija je posebno povezana sa uznapredovalom bolešću i ocenjuje sve uznapredovale CIN2/3 lezije (100%; 29/29; 95% CI: 88–100) kao pozitivne na hipermetilaciju, u poređenju sa 47% (9/19; 95% CI: 27– 69) ranih CIN 2/3 lezija.

* Napomena: Hipermetilacija ciljeva u uzorcima žena koje imaju uznapredovalu CIN leziju i/ili karcinom grlića materice može ostati neotkrivena zbog varijabilnosti uzorkovanja, na primer kao rezultat neadekvatnog uzorkovanja.

Robusnost

Robusnost QIASure Methylation Test određena je kao slaganje između rezultata QIASure Methylation Test i verzije ispitivanja samo za istraživačke svrhe (Research Use Only, RUO). Ispitivanje je izvršeno na bisulfitno konvertovanoj genomskoj DNK dobijenom iz 10 cervikalnih uzoraka pozitivnih na visokorizični HPV od kojih je 5 prethodno identifikovano kao negativno na hipermetilaciju za oba markera, a 5 kao pozitivno na metilaciju (npr. za najmanje jedan od 2 markera). Ispitivanje je izvedeno u dva primerka u 8 obrada od strane četiri različita operatera (jedna obrada po operateru dnevno) koristeći dve različite serije i tri različita Rotor-Gene Q MDx instrumenta u dve različite laboratorije. Ukupno je dobijeno 16 tačaka podataka za svaki uzorak (Tabela 7).

Tabela 7. Slaganje QIASure Methylation Test u odnosu na RUO verziju ispitivanja

Broj uzorka	RUO rezultat	Slaganje laboratorije 1 u poređenju sa RUO	Slaganje laboratorije 2 u poređenju sa 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)
Međuvrednost		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)
Međuvrednost		100% (40/40)	100% (40/40)

Četiri od pet uzoraka koji su prethodno identifikovani kao negativni na metilaciju pokazali su 100% slaganje prilikom korišćenja QIASure Methylation Test u obe laboratorije. Uzorak 3 pokazao je slaganje od 62,5% (5/8) u obe laboratorije. Uočena varijacija odnosila se na *FAM19A4* sa nivoima oko granične vrednosti ispitivanja. Ukupno slaganje između uzoraka negativnih na metilaciju bilo je 92,5% (37/40).

Svih 5 uzoraka koji su prethodno identifikovani kao pozitivni na metilaciju pokazali su 100% slaganje sa referentnim ispitivanjem, tako da je ukupno slaganje bilo 100% (40/40).

Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnim uzorcima

Protokol „Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit“ (Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnom uzorku korišćenjem EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit) verifikovan je u odnosu na referentni protokol (tj. bisulfitna konverzija uz prethodnu kontrolu količine uzorka DNK) na 119 cervikalnih strugotina praćen QIASure Methylation Test. Stopa uspešnosti za bisulfitnu konverziju direktno na cervikalnim uzorcima pomoću 2,5% unosa cervikalnog uzorka bila je 95,8% (114/119) i porasla je na 100% nakon ponovnog ispitivanja nevažećih uzoraka sa 10% unosa cervikalnog uzorka. Slaganje rezultata QIASure Methylation Test između protokola bisulfitne konverzije je 90,8% (108/119; kapa vrednost 0,75).

Protokol „Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the QIASymphony Bisulfite Kit“ (Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnom uzorku koristeći QIASymphony Bisulfite Kit) verifikovan je u odnosu na referentni protokol (tj. bisulfitna konverzija uz prethodnu kontrolu količine uzorka DNK) na 120 cervikalnih strugotina praćen QIASure Methylation Test. Stopa uspešnosti za bisulfitnu konverziju direktno na cervikalnim uzorcima pomoću 2,5% unosa cervikalnog uzorka bila je 94,2% (113/120) u poređenju sa 97,5% (117/120) sa referentnim protokolom. Slaganje rezultata QIASure Methylation Test između protokola bisulfitne konverzije je 94,7% (107/113; kapa vrednost 0,88).

Reference

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

Sledeći simboli mogu da se nalaze na pakovanju i oznakama:

Simbol	Definicija simbola
	Upotrebiti do
	Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku
	Simbol CE-IVD oznake
	Sadrži reagense koji su dovoljni za <N> reakcija
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala
	Komponente
	Sadrži
	Broj
Rn	„R“ označava reviziju Uputstva za upotrebu (priručnika), a „n“ je broj revizije
	Globalni broj trgovinske jedinice
	Temperaturno ograničenje
	Proizvođač
	Zaštitište od svetlosti



Pogledajte uputstvo za upotrebu



Oprez

Kontakt informacije

Tehničku pomoć i više informacija potražite u našem Centru za tehničku podršku na adresi www.qiagen.com/Support, telefon 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od QIAGEN odeljenja za tehničku pomoć ili svojim lokalnim dobavljačima (pogledajte poledinu ili posetite adresu www.qiagen.com).

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QIASure Methylation Test Kit	Za 72 reakcije: 2 master miksa, 2 kalibratora.	616014
QIAasymphony SP	Modul za pripremu uzorka QIAasymphony uključuje 1-godišnju garanciju za delove i rad (opciono za automatizovanu ekstrakciju)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR ciklusni uređaj i analizator topljenja visoke rezolucije sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, jarko crven) plus HRM kanal, laptop računar, softver, dodatni pribor: uključuje 1-godišnju garanciju za delove i rad, instalaciju i obuku	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR ciklusni uređaj i analizator topljenja visoke rezolucije sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, jarko crven) plus HRM kanal, laptop računar, softver, dodatni pribor, sadrži 1-godišnju garanciju za delove i rad, instalacija i obuka nisu uključeni	9002032

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
Rotor-Gene Q MDx dodatni pribor		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminijumski stalak za epruvete za ručnu postavku reakcije sa pipetom od jednog kanala u epruvetama od 72 × 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 traka sa po 4 epruvete i poklopca za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1mL (2500)	10 × 250 traka sa po 4 epruvete i poklopca za 10.000 reakcija	981106
Rotor-Gene AssayManager – za rutinsko ispitivanje sa Rotor-Gene Q MDx instrumentima		
Rotor-Gene AssayManager	Softver za rutinsko ispitivanje u kombinaciji sa Rotor-Gene Q i QIA Symphony RGQ instrumentima; softver sa jednom licencom za instaliranje na jednom računaru	9022739

Najnovije informacije o licenciranju i odricanjima od odgovornosti za konkretan proizvod potražite u odgovarajućem priručniku za komplet kompanije QIAGEN ili korisničkom priručniku. Priručnici za komplet kompanije QIAGEN i korisnički priručnici dostupni su na adresi www.qiagen.com, a možete da ih zatražite i od tehničke službe kompanije QIAGEN ili svog lokalnog dobavljača.

Ova stranica je namerno prazna.

Istorija revizija dokumenta

Datum	Promene
R4, jun 2019.	Revidiran je dijagram procedure radnog toka pod Principi procedure; dodat je EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit u Potreban materijal koji se ne isporučuje; revidiran je sadržaj okvira Informacije o bezbednosti; dodane su informacije o probnoj obradi za RGQ MDx 5-plex HRM; revidiran je odeljak Priprema uzorka; dodata je dodatna stavka za rešavanje problema; dodana je tema Bisulfitna konverzija direktno na cervikalnim uzorcima pod Karakteristike učinka; ažuriran je odeljak Reference; ažuriran je raspored
R5, jul 2023.	Dodati instrumenti za QIASymphony za opcionu automatizaciju ekstrakcije i QIASymphony Bisulphite Kit u odeljku „Potreban materijal koji se ne isporučuje”; Revidiran odeljak o pripremi uzorka; Dodata upotreba medijuma za prikupljanje SurePath; Revidiran odeljak o kliničkom učinku. Dodati naslovi za Tabelu 5 i Tabelu 6.

Ugovor o ograničenoj licenci za QIASure Methylation Test

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

- Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučenih komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu i dodatnim protokolima dostupnim na adresi www.qiagen.com. Neke od ovih dodatnih protokola su obezbedili korisnici QIAGEN proizvoda za korisnike QIAGEN proizvoda. Kompanija QIAGEN nije detaljno testirala niti optimizovala te protokole. Kompanija QIAGEN ne daje garancije za njih niti tvrdi da oni ne krše prava nezavisnih proizvođača.
- Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne garantuje da ovaj komplet i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
- Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu upotrebu i ne smeju da se ponovo koriste, doraduju ili ponovo prodaju.
- Kompanija QIAGEN posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
- Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u prethodnom tekstu. QIAGEN može da primeni zabrane ovog Ugovora o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Ugovora o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na komplet i/ili njegove komponente.

Da biste videli ažurirane uslove licenciranja, posetite www.qiagen.com.

Self-screen B.V. je zakonski proizvođač QIASure Methylation Test.

QIASure Methylation Test proizvodi kompanija Self-screen B.V. i distribuira kompanija QIAGEN u Evropi.

Zaštićeni 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.). Registrovani nazivi, robne marke itd., koji se koriste u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno naznačeni kao takvi, zaštićeni su zakonom.

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

Porudžbine: www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška: support.qiagen.com | Veb-lokacija www.qiagen.com