

Juli 2023

QIAzure™ Methylation Test

Bruksanvisning (Handbok)



Version 1

För användning med Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM-instrument



616014

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

1132288SV

Innehåll

Avsedd användning	4
Sammanfattning och förklaring	5
Princip för proceduren	5
Material som medföljer	7
Kitinnehåll	7
Material som behövs men inte medföljer	7
Varningar och försiktighet	10
Säkerhetsinformation	10
Allmänna säkerhetsåtgärder	10
Säkerhetsåtgärder för AssayManager-profilen	12
Förvaring och hantering av reagenser	13
Hantering och förvaring av prover	14
Provberedning för prover lagrade i PreservCyt	16
Provberedning för prover lagrade i SurePath™	19
Allmänna rekommendationer för bisulfitkonvertering	20
Protokoll: QIASure Methylation Test PCR i instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	21
Avläsning av resultat	34
Felsökningshandbok	38
Begränsningar	41
Prestandaegenskaper	43
Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)	43
Linjäritet	43

Precision	43
Interfererande ämnen.....	44
Klinisk prestanda.....	45
Robusthet.....	48
Referenser.....	51
Symboler	53
Kontaktinformation.....	54
Beställningsinformation.....	55
Dokumentrevisioner.....	58

Avsedd användning

QIASure Methylation Test (kat.nr 616014) är en multiplex metyleringsspecifik real-time PCR analys- i för detektering av promotor-hypermetylering av generna *FAM19A4* och *hsa-mir124-2*. Prover som kan testas med QIASure Methylation Test innehåller bisulfitkonverterat DNA isolerat från prover som samlats in på följande sätt:

- Cervixprover som tagits av en läkare med *digene*® HC2 DNA Collection Device
- Cervixprover som tagits av en läkare med en provtagningsborste och som sedan placerats i PreservCyt® Solution eller i SurePath™ Solution
- Vaginalprover som tagits av patienten med en provtagningsborste

Indikationer för användning:

1. Som ett uppföljningstest för kvinnor med ett positivt humant papillomavirus (HPV) -test, för att fastställa behovet av remiss till kolposkopi eller andra uppföljningsåtgärder.
2. Som ett uppföljningstest för kvinnor med resultat från gynekologiskt celltest med atypiska skivepitelceller av obestämd signifikans (ASC-US), för att fastställa behovet av remiss till kolposkopi eller andra uppföljningsåtgärder.

Den här produkten är endast avsedd att användas av professionella användare som tekniker och laboratorieanställda som har utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer, molekylärbilogiteknik och systemet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

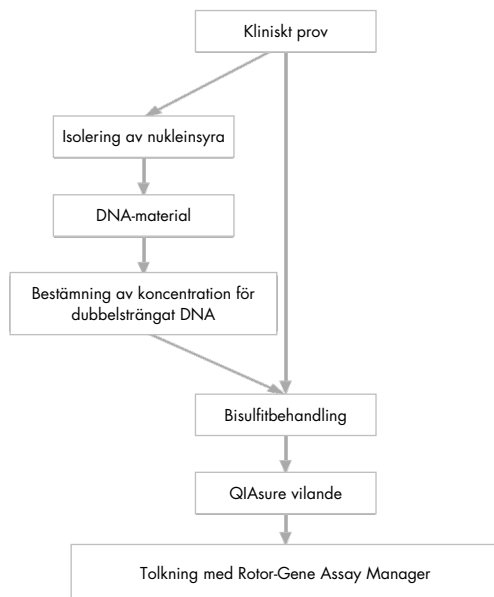
Sammanfattning och förklaring

DNA-metylering är en biokemisk process som är viktig för normal utveckling i högre organismer (1). Den inkluderar tillägg av en metylgrupp i den 5:e positionen av pyrimidinringen hos cytosinnukleotiden. Onormala mönster i DNA-metyleringen spelar också en viktig roll vid carcinogenes. Promotor-hypermetylering av generna *FAM19A4* (familj med sekvenslikhet 19 (kemokin (Cc-motiv)-liknande) medlem A4) och/eller *hsa-mir124-2* (*homo sapiens mikro RNA 124-2*) har detekterats (2–6) i flera humana cancertyper och cancercellinjer, inklusive cervixcancer och endometriecancer. Analys av promotor-metylering i värdcellen detekterar specifikt cancer och så kallade "avancerade" CIN-lesioner (cervikal intraepitelial neoplasia), som innehåller en cancerliknande metyleringsprofil och har en hög risk för att utvecklas till cancer på kort sikt (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). QIASure-analysen möjliggör detektion av promotor-hypermetylering av generna *FAM19A4* och *hsa-mir124-2* i bisulfitkonverterat DNA som har isolerats från cervix- eller vaginalprover med ACTB (human β -aktinen) som en intern provkvalitetskontroll.

Princip för proceduren

QIASure Methylation Test är ett multiplext real-time PCR-test som förstärker de metylerade promotor-regionerna i tumörsuppressorgenerna *FAM19A4* och *hsa-mir124-2*, samt ett metylerings-icke-specifikt fragment i en referensgen. Kitet innehåller 2 rör med QIASure Master Mix och 2 rör med QIASure Calibrator. Masterblandningen är avsedd för amplifiering av bisulfitkonverterat DNA som har beretts från kliniska prover. Masterblandningen innehåller primrar och prober för målgenerna och referensgenen, som fungerar som intern provkvalitetskontroll. Kalibratoren är en lineariserad plasmid som innehåller sekvenser av *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* och ACTB-amplikoner.

Arbetsflöde för proceduren



QIASure-analysen körs på instrumentet Rotor-Gene Q MDx, och programmet Rotor-Gene AssayManager® utför dataanalys och tolkning automatiskt. C_T -värdet (cykeltröskelvärde) representerar antalet PCR-cykler som behövs för detektion av en fluorescenssignal över en bakgrundssignal, vilket korrelerar med antalet målmolekyler som förekommer i provet. QIASure-analysen beräknar ΔC_T -värdet som skillnaden mellan C_T -värdet för *FAM19A4*- eller *hsa-mir124-2*-målgenen och C_T -värdet för referensgenen (ACTB). Detta ΔC_T -värde är ett relativt kvantitativt värde för promotor-metyleringsnivån i *FAM19A4*- eller *hsa-mir124-2*-genen. För normalisering subtraheras ΔC_T -värdet för ett kalibratorprov från ΔC_T -värdet för *FAM19A4*- eller *hsa-mir124-2*-målgenerna, vilket resulterar i ett $\Delta\Delta C_T$ -värde (9). Kalibratoren är ett standardiserat plasmid-DNA-prov med ett lågt känt antal kopior av de tre målgenerna (dvs. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* och ACTB).

Material som medföljer

Kitinnehåll

QIASure Methylation Test		72
Katalognr		616014
Antal reaktioner		72
QIASure Master Mix (2 rör)	Rör med brun färg	630 µl
QIASure Calibrator (2 rör)	Rör med transparent färg	25 µl
Bruksanvisning till QIASure Methylation Test (handbok)		1

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Förbrukningsartiklar och reagenser för provberedning av självtagna prover

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Reagenser för beredning av prover lagrade i SurePath-provtagningsmedium.

- Buffer AL (QIAGEN katalognummer: 19075)

Förbrukningsartiklar och reagenser för bisulfitkonvertering

Verifierade bisulfitkonverteringskit innehåller:

- 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)

Förbrukningsartiklar för instrumentet Rotor- Gene Q MDx

- Strip Tubes and Caps, 0,1 mL (kat.nr 981103)
- Renat vatten (t.ex. vatten avsett för molekylärbiologi, destillerat eller avjoniserat)

Utrustning

- Justerbara pipetter* avsedda för PCR (1–10 µL; 10–100 µL)
- Engångshandskar
- Bänkcentrifug* med en hastighet på > 10 000 rpm
- Vortexblandare*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, kat.nr Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, kat.nr ND-3300) eller motsvarande
- QIASymphony SP System (kat.nr 9001297) för valfri automatisk extraktion och/eller bisulfitkonvertering

* Säkerställ att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

Utrustning för real-time PCR

- Systemet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat.nr 9002033) eller instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat.nr 9002032)*
- Programmet Rotor-Gene AssayManager Core Application version 1.0.x (där x är större än eller lika med 4
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in installerat, version 1.0.x (där x är större än eller lika med 1)
- QIASure Assay Profile (från filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (där Y är lika med eller större än 1) för tillämpning på bisulfitkonverterat DNA från cervixprover som tagits av läkare
- QIASure Assay Profile för självtagna borstprover (från filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (där Y är lika med eller större än 0) för tillämpning på bisulfitkonverterat DNA som erhållits från vaginala prover som har tagits av patienten

* Instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum januari 2010 eller senare. Tillverkningsdatumet kan utläsas från serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret har formatet "mmyyynn", där "mm" anger månaden i tillverkningsdatumet med siffror, "yy" anger de två sista siffrorna i tillverkningsåret och "ynn" är en unik identifieringskod för instrumentet.

Varningar och försiktighet

Endast för in vitro-diagnostisk användning.

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS). Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut datablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN®.

QIASURE MASTER MIX



Innehåller: 1,2,4-triazol: Fara! Misstänks kunna skada fertiliteten eller det ofödda barnet. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Användning av PCR-tester kräver god laboratoriesed, inklusive underhåll av utrustning, som är speciellt anpassad till molekylärbiologi och som uppfyller tillämpliga regler och relevanta standarder.

Lägg alltid särskild vikt vid följande:

- Använd puderfria engångshandskar, en laboratorierock och skyddsglasögon vid hantering av prover.

- Förhindra mikrobiell och nukleas (DNase) kontaminering av proverna och kitet. DNase kan orsaka försämring av DNA-mallen.
- Undvik överföring (carryover) av kontaminering till DNA- eller PCR-produkter, vilket kan orsaka en falskt positiv signal.
- Använd alltid engångspipettspetsar med aerosolbarriärer fria från DNase.
- Reagenserna i QIASure-analysen har späts ut optimalt. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda.
- Alla reagenser som medföljer QIASure-kitet är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Byt inte ut något reagens från ett kit mot samma reagens från ett annat QIASure-kit (även om det kommer från samma batch), eftersom detta kan påverka prestandan.
- Ytterligare instruktioner om varningar och säkerhetsåtgärder samt fler procedurbeskrivningar finns i användarhandboken till Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.
- Utför en uppvärmningskörning för Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM i 95 °C i 10 minuter före dagens första körning.
- Ändring av inkubationstider och temperaturer kan orsaka felaktiga eller icke överensstämmande data.
- Använd inte komponenter i kitet efter utgångsdatum, eller om de har förvarats felaktigt.
- Minimera komponenternas exponering för ljus: Reaktionsmixar kan ändras om de utsätts för ljus.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra att mixarna kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial som finns i PCR-reagenserna.
- Kassera prov- och analysavfall i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

Säkerhetsåtgärder för AssayManager-profilen

Det krävs olika AssayManager-profiler för olika provtyper. Säkerställ att rätt profil används för den provtyp som ska testas, enligt nedan:

- Analysprofilen "QIASure cervixskrapning" (från filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) måste användas för testning av bisulfitkonverterat DNA från cervixprover som tagits av läkare.
- Analysprofilen "QIASure-prover som har tagits av patienten" (från filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) måste användas för testning av bisulfitkonverterat DNA från självtagna vaginala borstprover.

Förvaring och hantering av reagenser

Leveransvillkor

QIASure Methylation Test levereras på torris. Om någon komponent i QIASure Methylation Test inte är frusen vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, handböcker eller reagenser i leveransen ska du kontakta någon av QIAGENS tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Förvaringsförhållanden

QIASure Methylation Test måste vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 °C till -15 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus.

Stabilitet

Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är QIASure Methylation Test hållbart fram till det utgångsdatum som anges på förpackningens etikett.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15 °C. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte 3 frysings-/upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna.

- Blanda försiktigt genom att vända röret 10 gånger och centrifugera alla rör innan de öppnas.
- Utgångsdatum för reagenserna anges på etiketterna till varje enskild produkt. Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren har produkten full prestanda under hela stabilitetstiden så länge komponenter från samma batchar används.

Hantering och förvaring av prover

IAKTTAG FÖRSIKTIGHET 	Alla prover måste behandlas som potentiellt infektiöst material.
--	--

Cervixprover

QIASure-kitet är avsett för användning med bisulfitkonverterade prover av genomiskt DNA som erhållits från cervixprover. Validerade provtagningsmedier för cervixprover (skrapprover) är PreservCyt®-provtagningsmedium, SurePath™-provtagningsmedium och *Digene* Specimen Transport Medium (STM). Den optimala förvaringstemperaturen för kliniska prover är 2–8 °C vid ankomst till laboratoriet. Under dessa förvaringsförhållanden är prover i PreservCyt eller SurePath™-provtagningsmedium stabila i 3 månader innan DNA-extraktion.

OBS! Cervixprover i STM kan levereras i 2–30 °C för leverans nästa dag till test-laboratoriet, och frysas om i -20 °C vid mottagandet.

Vaginala borstprover som har tagits av patienten

QIASure Methylation Test är avsett för användning med bisulfitkonverterade prover av genomiskt DNA som extraherats från självtagna vaginala borstprover. Vaginala borstprover som har tagits av patienten kan samlas in och transporteras torra och förvaras i PreservCyt-provtagningsmedium med en rekommenderad förvaringsvolym på 2–3 mL vid ankomst till laboratoriet. Prover i PreservCyt-provtagningsmedium kan förvaras i 2–8 °C eller i rumstemperatur i högst 3 månader.

Prover med genomiskt DNA

När det genomiska DNA:t har extraherats kan DNA-proverna förvaras och levereras i -30 °C till -15 °C i upp till 12 månader.

Provberedning för prover lagrade i PreservCyt

QIASure Methylation Test har validerats för användning med bisulfitkonverterat genomiskt DNA som extraherats från cervixprover. Bisulfitkonvertering av genomiskt DNA kan utföras:

- i) med tidigare DNA-extraktion och DNA-kvalitetskontroll, eller
- ii) direkt för cervixprovet med hjälp av EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat.nr 59720) eller
- iii) direkt på cervixprovet med QIA Symphony Bisulfite Kit (QIAGEN kat.nr. 931106).

Vår rekommendation beskrivs nedan.

- i) Bisulfitkonvertering med tidigare DNA-extraktion och DNA-kvalitetskontroll
Detta protokoll kräver DNA-extraktion, mätning av DNA-koncentration, följt av alikvotering av optimal elueringsvolym innan man börjar med bisulfitkonverteringsprotokollet, och har verifierats för EZ DNA Methylation™ Kit (kat.nr D5001) och EZ DNA Methylation-Lightning Kit (kat.nr D5030) från ZYMO Research. Vi rekommenderar följande metoder:
 - DNA-extraktion
DNA-extraktionskit i standardformat (t.ex. kolumnbaserade och magnetiska pärlbaserade kit) är kompatibla med QIA Sure Methylation Test.
 - Mätning av DNA-koncentration
Mät DNA-koncentrationen före bisulfitkonvertering av DNA. Lämpliga system för mätning av DNA-koncentrationer är Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (båda från Thermo Fisher Scientific) eller motsvarande.

- Alikvotering av DNA-eluat
Intervallet för optimal DNA-input för bisulfitkonvertering är mellan 100 ng och 2 µg, och 200 ng rekommenderas för bisulfitkonvertering. Om DNA-koncentrationen är för låg för bisulfitkonverteringen upprepar du DNA-extraktionen med en högre inputvolym för det kliniska provet eller eluerar DNA:t i en mindre elueringsvolym.
- Bisulfitkonvertering med EZ DNA Methylation Kit och EZ DNA Methylation-Lightning Kit utförs enligt tillverkarens rekommendation.

OBS! Enligt EZ DNA Methylation Kit ska den maximala inputen av prov-DNA inte överstiga 2 µg för att en tillräckligt hög effektivitet (> 98 %) ska erhållas vid konverteringen.

- ii) Bisulfitkonvertering direkt på cervixprovet med EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit
Bisulfitkonvertering som utförs direkt på cervixprovet och som samlas in i PreservCyt® Solution har verifierats för EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit från QIAGEN. Vi hänvisar till handboken *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion* för prover med hög DNA-koncentration (1 ng–2 µg) enligt tillverkarens rekommendation, med undantag för följande artiklar:
 - Steg 1 i protokollet. Ta 2,5 % av cervixprovet i PreservCyt®-provtagningsmedium (dvs. 500 µL från 20 mL) och pellet genom centrifugering vid minst 3390 x g i 10 minuter. Kassera supernatanten som lämnar cellpelleten vid maximalt 20 µL PreservCyt-provtagningsmedium. För bisulfitkonverteringsreaktionen, använd detta cellpellet-prov och fortsätt med steg 2 i tillverkarens protokoll.
 - Buffer BL: Lägg inte till bärar-RNA.
 - Elueringsvolymen för bisulfitkonverterat DNA är 50 µL Buffer EB för varje prov.

- *iii) Bisulfitkonvertering direkt på cervixprovet med QIAAsymphony Bisulfite Kit*
 Bisulfitkonvertering som utförs direkt på cervixprovet och som samlas in i PreservCyt® Solution har verifierats för kittet QIAAsymphony Bisulfite från QIAGEN. Vi hänvisar till handboken för kittet QIAAsymphony Bisulfite, och testning utförs enligt tillverkarens rekommendationer.
 - Ta 2,5 % av cervixprovet i PreservCyt®-provtagningsmedium (dvs. 500 µL från 20 mL) och pellet genom centrifugering vid minst 3390 x g i 10 minuter. Kassera supernatanten som lämnar cellpelleten och vid maximalt 20 µL av resterande PreservCyt-provtagningsmedium.
 - För bisulfitkonverteringsreaktionen, följ "QIAAsymphony SP-protokollbladet – Bisulfite 140_HC_V" med början på steg 2, och använd cellpelleten istället för DNA.
 - När bisulfitkonverteringsreaktionen är klar, starta en SP-körning på QIAAsymphony genom att följa stegen som beskrivs i protokollet "Bisulfitkonvertering av ometylerade cytosiner i olika provtyper" från handboken till QIAAsymphony Bisulfite Kit. Eluering görs med 40 µL.

Provberedning för prover lagrade i SurePath™

Prover som lagras i SurePath måste förbehandlas innan DNA-extraktion. QIASure Methylation Test har validerats för användning med bisulfitkonverterat genomiskt DNA som extraherats från cervixprover enligt proceduren nedan.

- Ta 2,5 % av cervixprovet
- Centrifugera i 10 minuter vid 4 000 g, ta bort supernatanten, men lämna kvar 100 µL SurePath™
- Tillsätt 100 µL Buffer AL och återsuspendera pelleten.
- Blanda väl och inkubera i 20 minuter vid 90 °C
- Kyl ner i 5 minuter vid rumstemperatur.
- Utför DNA-extraktion med mini-kittet QIAamp DNA (eller motsvarande) enligt tillverkarens instruktioner, eluera DNA i 50 µL.
- Mät DNA-koncentrationen. Lämpliga system är Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (båda från Thermo Fisher Scientific) eller motsvarande.
- 200 ng DNA rekommenderas för bisulfitkonvertering. Om 200 ng inte är tillgängligt, använd den maximala inputvolymen. Utför omvandlingen med metyleringskittet EZ DNA eller kittet EZ DNA Methylation-Lightning (Zymo) enligt tillverkarens instruktioner. Använd 2,5 µL eluat för QIASure Methylation Test.

Allmänna rekommendationer för bisulfitkonvertering

Bisulfitkonverteringsreaktionen ska utföras i ett anpassat utrymme som är separerat från den plats där QIASure Master Mix förvaras och fördelas, för att undvika att reagenserna kontamineras.

Inmatningen i QIASure-reaktionen är 2,5 µL bisulfitkonverterat DNA.

Om den interna provkvalitetskontrollen är negativ (dvs. ACTB C_T-värdena är > 26,4) resulterade provberedningen med bisulfitkonverterat DNA i material med otillräcklig kvantitet och/eller kvalitet och bedöms som ogiltig. Utför de rekommenderade stegen för att nå ett ACTB C_T-värde som är inom det giltiga intervallet för följande:

- Bisulfitkonvertering med tidigare DNA-extraktion och DNA-kvantitetskontroll: Upprepa bisulfitkonverteringsreaktionen med en högre input av prov-DNA och/eller upprepa DNA-isoleringen med en högre input av cervixprov
- Bisulfitkonvertering direkt på cervixprov: Upprepa bisulfitkonverteringsreaktionen med 10 %* av cervixprovet i PreservCyt-provtagningsmedium (dvs. 2 mL från 20 mL).

Bisulfitkonverterat DNA kan förvaras i upp till 24 timmar i 2–8 °C, upp till 5 dagar i -25 °C till -15 °C och upp till 3 månader under -70 °C. Undvik alltid att frysa och tina bisulfitkonverterat DNA upprepade gånger. Antalet frysings-/upptiningscykler ska inte överstiga tre för att bibehålla godkänd kvalitet.

* Provvolymen för direkt bisulfitkonvertering kan ökas vid otillfredsställande resultat på grund av provtagningsvariabilitet, till exempel som ett resultat av otillräcklig provtagning.

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

Viktigt att tänka på före start

- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM innan du startar protokollet. Se användarhandboken till instrumentet (kat.nr 9002033 eller 9002032).
- Utför en uppvärmningskörning för Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM i 95 °C i 10 minuter före dagens första körning.
- Rotor-Gene AssayManager v. 1.0 möjliggör automatisk tolkning av PCR-resultaten. QIASure-kitet måste köras på instrumentet Rotor-Gene Q MDx med Rotor-Gene AssayManager v1.0. Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene AssayManager v1.0 (kat.nr 9022739), och Epsilon Plug-In, och läs användarhandböckerna till dem.
- Det krävs olika Rotor-Gene AssayManager v1.0 Assay Profiles för olika provtyper. Säkerställ att rätt profil används för den provtyp som ska testas, enligt nedan. Säkerställ att rätt profil används för den provtyp som ska testas, enligt nedan:
 - Analysprofilen "QIASure cervixskrapning" (från filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) måste användas för testning av bisulfitkonverterat DNA från cervixprover som tagits av läkare.
 - Analysprofilen "QIASure-prover som har tagits av patienten" (från filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) måste användas för testning av bisulfitkonverterat DNA från självtagna vaginala borstprover.

* Instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum januari 2010 eller senare. Tillverkningsdatumet kan utläsas från serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret har formatet "mmyynnn" där "mm" anger månaden i tillverkningsdatumet med siffror, "yy" anger de två sista siffrorna i tillverkningsåret och "nnn" är en unik identifieringskod för instrumentet.

OBS! Endast en provtyp per experiment kan testas. De individuella analysprofilerna har optimerats för varje provtyp, och kunderna måste välja rätt analysprofil för att erhålla optimala resultat för varje specifik provtyp.

Saker som måste göras före start

- Programmet Rotor-Gene AssayManager version v1.0.x (där x är större än eller lika med 4) måste installeras på datorn som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx. Detaljerad information om installation av Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application finns i *användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application*.
 - Det krävs ett specifikt plugin-program för QIASure Methylation Test som heter "Epsilon Plug-in" (version 1.0.1 eller högre). Du kan ladda ned detta plugin-program från QIAGEN webbplats på adressen: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Detta plugin-program måste installeras på en dator som redan har Rotor-Gene AssayManager version 1.0.x (där x är större än eller lika med 4) installerat.
 - Det krävs en analysprofil för QIASure Methylation Test för körning med programmet Rotor-Gene AssayManager v1.0. Den här analysprofilen innehåller alla parametrar som behövs för cykling och analys av experimentet. Det finns 2 QIASure Assay Profiles:
 - Analysprofilen "QIASure cervixskrapning" (från filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)" motsvarar cervixprover som tagits av läkare
 - Analysprofilen "QIASure-prover som har tagits av patienten" (från filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)" motsvarar självtagna vaginala borstprover. Profilerna kan laddas ner från webbsidan för QIASure Methylation Test: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Analysprofilen måste importeras till Rotor-Gene AssayManager-programmet.
- OBS! QIASure-kitet kan bara köras om vissa konfigurationsinställningar har gjorts i programmet Rotor-Gene AssayManager v1.0.

För en systemomfattande processsäkerhet måste följande obligatoriska konfigurationsinställningar göras för det stängda läget:

- "Material number required" (Materialnummer krävs)
- "Valid expiry date required" (Giltigt utgångsdatum krävs)
- "Lot number required" (Lotnummer krävs)

Installation av Epsilon Plug-in och import av analysprofilen

Installation och import av Epsilon-plugin-programmet och analysprofilen beskrivs i *användarhandboken till Rotor-Gene AssayManager Core Application* och i *användarhandboken till Epsilon-plugin-programmet*.

- Ladda ned både Epsilon-plugin-programmet och den senaste versionen av analysprofilen QIASure Assay Profile från QIAGENs webbplats.
- Starta installationsprocessen genom att dubbelklicka på filen EpsilonPlugin.Installation.msi och sedan följa instruktionerna för installation. Se avsnittet om installation av plugin-program i *Användarhandbok till AssayManager Core Application* för en detaljerad beskrivning av den här processen.

OBS! För en systemomfattande processsäkerhet väljer du fliken Settings (Inställningar) och markerar kryssrutorna för Material number required (Materialnummer krävs), Valid expiry date required (Giltigt utgångsdatum krävs) och Lot number required (Lotnummer krävs) för det stängda läget (avsnittet "Work list" (Arbetslista)). Markera kryssrutorna om de inte redan är markerade.

- När plugin-programmet har installerats måste en person med administratörsrättigheter för programmet Rotor-Gene AssayManager importera AP_QIASure_V1_0_Y.iap-analysprofilen på följande sätt.



1. Öppna Rotor-Gene AssayManager-programmet genom att klicka på ikonen. Fönstret till Rotor-Gene AssayManager öppnas (se bild 1).

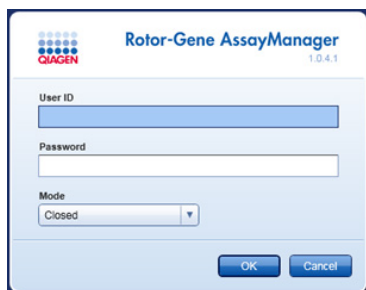
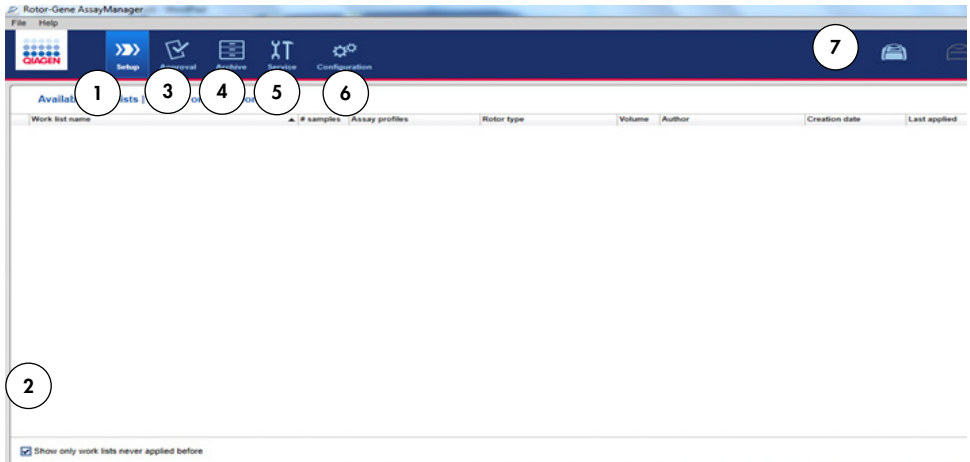


Bild 1. Inloggningskärm för Rotor-Gene AssayManager.

2. Logga in på Rotor-Gene AssayManager med ditt användar-ID och lösenord. Ändra inte "stängt" läge. Klicka på OK. Skärmen Rotor-Gene Assay Manager öppnas (se nedan).



- 1 Fliken Set-up (Installation). Den här fliken tillåter hantering eller tillämpning av arbetslistor.
 - 2 Kontroll av de arbetslistor som används visar endast nya arbetslistor.
 - 3 Fliken Approval (Godkänna). På den här fliken kan du söka efter tidigare utförda experiment (körningar).
 - 4 Fliken Archive (Arkiv). Här kan du söka efter gamla experiment (körningar) som redan har godkänts.
 - 5 Fliken Service. Visar en rapport med ett granskningsspår för varje fil som skapats av programmet
 - 6 Fliken Configuration (Konfiguration). Tillåter konfiguration av alla programparametrar
 - 7 Rotor-Gene Q MDx-ikoner.
3. Välj konfigurationsmiljön.
4. Välj fliken Assay Profiles (Analysprofiler).
5. Klicka på Import (Importera).
6. Välj analysprofilen AP_QIAzure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap för cervixprover och/eller analysprofilen AP_QIAzure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap som ska importeras och klicka på Open (Öppna).
7. När analysprofilen har importerats kan den användas i miljön "Setup" [Installation].
- OBS! Samma version av en analysprofil kan inte importeras två gånger.



Inte ansluten



Ansluten

Provbearbetning på Rotor-Gene Q- MDx instrument med 72-rotor

Upp till 70 bisulfitkonverterade DNA-prover kan testas inom samma körning (experiment), förutom en kalibrator och en kontroll utan mall. I schemat i tabell 1 finns ett exempel på konfiguration av laddningsblock eller rotor för en körning med QIASure Methylation Test. Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

Tabell 1. Platt- och rotorkonfiguration för en körning med QIASure-kittet på instrumentet Rotor-Gene Q MDx

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

IAKTTAG FÖRSIKTIGHET 	Rören måste sättas in i rotorn enligt tabell 1. Inställningen för automatisk analys i analysprofilen är baserad på denna placering. Om du använder en annan layout blir resultaten avvikande.
--	--

OBS! Fyll alla oanvända positioner med tomma rör.

PCR på Rotor-Gene Q MDx-instrument med rotor med 72 rör

Utför en uppvärmningskörning för Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM i 95 °C i 10 minuter före dagens första körning.

1. Skapa en arbetslista för det prov som ska bearbetas på följande sätt:

- 1a. Slå på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
- 1b. Öppna programmet Rotor-Gene AssayManager och logga in som användare med operatörsbehörighet i stängt läge.
- 1c. Klicka på New work list (Ny arbetslista) i work list manager (inom miljön "Setup" (Installation)).
- 1d. Markera analysprofilen QIASure assay profile i listan över tillgängliga analysprofiler.

OBS! Analysprofilen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap motsvarar cervixprover; analysprofilen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap motsvarar vaginala borstprover som har tagits av patienten.

OBS! Endast en provtyp per experiment kan testas.

- 1e. Klicka på Move (Flytta) för att överföra den valda analysprofilen till listan med Selected assay profiles (Valda analysprofiler). Analysprofilen ska nu visas i listan "Selected assay profiles" (Valda analysprofiler).
- 1f. Ange antalet prover i det motsvarande fältet.

- 1g. Ange följande information om QIASure-kitet som är tryckt på locket till förpackningen.
 - Materialnummer: 1102417
 - Giltigt utgångsdatum med formatet ÅÅÅÅ-MM-DD
 - Lotnummer
- 1h. Välj steget Samples (Prover). En lista med provinformation visas på AssayManager-skärmen. Denna lista representerar den förväntade layouten för rotorn.
- 1i. Ange providentifikationsnumren i listan samt eventuell valfri provinformation som en kommentar för varje prov.
- 1j. Välj steget Properties (Egenskaper) och ange ett namn på arbetslistan (bild 2).

Bild 2. Properties (Egenskaper)

- 1k. Välj kryssrutan is applicable (Är tillämplig) och klicka på Apply (Tillämpa).
- 1l. Spara arbetslistan.
Arbetslistan kan skrivas ut, vilket kan vara till hjälp vid förberedelse och konfiguration av PCR. Om du vill skriva ut arbetslistan klickar du på Print work list (Skriv ut arbetslista). Provinformationen inkluderas som en del av denna arbetslista. OBS! Arbetslistan kan skapas när körningen är inställd i instrumentet, eller så kan arbetslistan sparas innan proverna läggs till i instrumentet.

2. Ställa in QIASure-körning.

För att minimera risken för PCR-reaktionskontaminering rekommenderas det starkt att ett PCR-skåp med UV-bestrålning används.

Dispensering av QIASure Master Mix måste utföras i ett område som är avskilt från området där DNA-bisulfitkonverteringsreaktionen utförs.

Rengör bänkytan, pipetterna och rörstället innan användning med en DNA-nedbrytande lösning för att förhindra mall- eller nukleaskontaminering.

OBS! Byt spets mellan varje rör så att du undviker eventuell ospecifik kontaminering från mall eller reaktionsmix, vilket kan leda till falskt positiva resultat.

2a. Tina QIASure Master Mix och QIASure Calibrator fullständigt, och skydda QIASure Master Mix mot ljus så mycket som möjligt.

OBS! Låt inte upptiningstiden överstiga 30 minuter eftersom materialet då kan försämrats.

2b. Blanda försiktigt genom att vända rören 10 gånger, och centrifugera dem sedan en kort stund före användning.

2c. Fördela 17,5 µL av den användningsklara QIASure Master Mix i rätt rör på remsa. Reaktionskonfigurationen kan utföras i rumstemperatur.

2d. Ställ tillbaka QIASure Master Mix i frysen för att undvika att materialet försämrats.

2e. Flytta rören till ett separat område för att fördela analyskontrollerna och de bisulfitkonverterade proverna.

2f. Tillsätt 2,5 µL vatten i kontrollen utan mall (NTC) i position 2 (se tabell 1 ovan). Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.

2g. Tillsätt 2,5 µL QIASure Calibrator i position 1 (se tabell 1 ovan). Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned och förslut röret med ett lock.

2h. Tillsätt 2,5 µL bisulfitkonverterat DNA i motsvarande rör. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.

2i. När en uppsättning med 4 rör har fyllts, förslut rören.

OBS! PCR-rören kan förvaras mörkt i 2-8 °C i 30 minuter mellan pipettering av prover i PCR-rören och start av experimentet i maskinen.

- 2j. Ställ tillbaka QIASure Calibrator i frysen för att undvika att materialet försämrats.
OBS! Byt spets mellan varje rör så att du undviker eventuell ospecifik kontaminering från mall eller reaktionsmix, vilket kan leda till falskt positiva resultat.
3. Förbered Rotor-Gene Q MDx och starta körningen (experimentet) på följande sätt:
- 3a. Placera en rotor med 72 brunnar på rotorhållaren.
 - 3b. Fyll rotorn med rör på remsa enligt deras tilldelade positioner, med början på position 1 enligt tabell 1, och med tomma förslutna rör på remsa i alla oanvända positioner.
- OBS! Se till att det första röret sätts in på position 1 och att rören på remsa placeras i rätt riktning och på rätt positioner enligt tabell 1.
- 3c. Sätt dit låsringen.
 - 3d. Ladda Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med rotorn och låsringen och stäng instrumentluckan.
 - 3e. I programmet Rotor-Gene AssayManager v1.0 väljer du den motsvarande arbetslistan i work list manager och klickar på Apply (Tillämpa) eller, om arbetslistan fortfarande är öppen, klickar du på Apply (Tillämpa.).
- OBS! Om ingen arbetslista har skapats för körningen loggar du in på Rotor-Gene AssayManager v1.0 och följer steg 1 innan du fortsätter.
- 3f. Ange namnet på körningen (experimentet).
 - 3g. I listan Cycler selection (Val av cykler) väljer du den cykel som ska användas.
 - 3h. Kontrollera att låsringen sitter fast på rätt sätt och bekräfta på skärmen att låsringen är fastsatt.
 - 3i. Klicka på Start experiment (Starta experiment).
Körningen av QIASure Methylation Test ska nu starta.
4. När körningen har slutförts klickar du på Finish run (Slutför körning).
5. Visa/lås upp och godkänna körningen.
- Användare som är inloggade med behörigheten "Approver" (Godkännare) ska klicka på Release and go to approval (Visa/lås upp och fortsatt till godkänna).
 - Användare som är inloggade med behörigheten "Operator" (Operatör) ska klicka på Release (Visa/lås upp).

6. Visa/lås upp resultaten.

- Om du klickade på Release and go to approval (Visa/lås upp och fortsätt till godkänna) visas resultaten för experimentet.
- Om en användare med behörighet som användare klickade på Release (Visa/lås upp) måste någon med behörigheten "Approver" (Godkännare) logga in och välja miljö "Approval" (Godkänna).
- Filtrera fram analysen som ska godkännas genom att välja filteralternativ och klicka på Apply (Tillämpa).
- Granska resultaten och godkänn resultaten för varje testprov.

Rolla till provet som ska godkännas i tabellen "Results". Varje provresultat som ska godkännas har tre radioknappar i slutet av den dedikerade raden.

Välj antingen accept (godkänn) eller reject (avvisa) resultatet för ett prov.

OBS! Ett resultat som automatiskt ställs in på INVALID (Ogiltigt) av Rotor-Gene AssayManager kan inte konverteras till ett giltigt resultat även om resultatet avslås.

Valfritt: Skriv in en kommentar i kolumnen "Sample comment" (Provkommentar).

- Klicka på Release/Report data (Visa/lås upp/rapportera data).
- Klicka på OK. Rapporten genereras i .pdf-format (Adobe Portable Document Format) och sparas automatiskt i den fördefinierade mappen. Som standard är sökvägen till denna mapp: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

OBS! Denna sökväg och mapp kan ändras i miljö "Configuration" (Konfiguration).

- Gå till fliken Archive (Arkiv) för att exportera .rex-filen som motsvarar rådatan. Leta upp ditt experiment med hjälp av filteralternativen och klicka på show assays (visa analyser). Klicka sedan på Export .rex file (Exportera .rex-fil) och spara den genom att klicka på OK. Programmet sparar automatiskt .rex-filen i följande fördefinierade mapp: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**

OBS! Du kan ändra den här sökvägen och mappen på fliken Specify the .rex file export destination (Ange exportplats för .rex-filen).

OBS! För felsökning krävs ett supportpaket från körningen. Supportpaket kan genereras via miljön "Approval" (Godkännande) eller "Archive" (Arkivering). Se *användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager Core Application*, avsnittet Felsökning, "Creating a support package" (Skapa ett supportpaket) på

<https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Dessutom kan granskningsspåret från tiden för incidenten ± 1 dag vara till god hjälp. Granskningsspåret finns i Service-miljön (användarhandbok till *Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Ta ut materialet från Rotor-Gene Q MDx-instrumentet och kassera rören på remsa i enlighet med lokala säkerhetsföreskrifter.

Avläsning av resultat

Analysen är helt automatisk.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyserar först förstärkningsgraferna, och kan ogiltigförklara avvikande kurvor beroende på deras form och brusamplitud. Om så är fallet associeras en flagga med den ogiltigförklarade kurvan (se tabell 2).

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyserar sedan körningskontrollerna:

- Kalibrator
- NTC

OBS! Rapporten som genereras i slutet av körningen visar resultaten som erhållits med körningskontroller, med ogiltigförklarande flaggor framför ogiltiga data.

Om alla kontrollerna i körningen överensstämmer kommer Rotor-Gene AssayManager att analysera de okända proverna.

I tabell 2 visas de ogiltigförklarande provflaggorna som kan tilldelas enskilda rör av Rotor-Gene AssayManager v1.0 under analysen, tillsammans med en förklaring av vad flaggan betyder.

Tabell 2. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer

Flagga	Beteende	Beskrivning
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ogiltigt)	Målvärdet är högre än det definierade intervallet. Det kan vara ett C_T -värde, slutpunktsfluorescensvärde, koncentrationsvärde eller ett beräknat värde, t.ex. genomsnittligt C_T -värde eller ΔC_T -värde.
ASSAY_INVALID (ANALYS OGILTIG)	Invalid (Ogiltigt)	Analysen är ogiltig eftersom minst en extern kontroll är ogiltig.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ogiltigt)	Målvärdet är lägre än det definierade intervallet. Det kan vara ett C_T -värde, slutpunktsfluorescensvärde, koncentrationsvärde eller ett beräknat värde, t.ex. genomsnittligt C_T -värde eller ΔC_T -värde.
CONSECUTIVE_FAULT (KONSEKUTIVT FEL)	Invalid (Ogiltigt)	Ett mål som användes vid beräkningen av det här målet är ogiltigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (AVVIKANDE KURVFORM)	Invalid (Ogiltigt)	Förstärkningsgrafen med rådata visar en form som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat.
FLAT_BUMP (VÄGBULA)	Invalid (Ogiltigt)	Förstärkningsgrafen med rådata visar en form som liknar en vägbula med svag upphöjning som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat (t.ex. felbestämning av C_T -värde).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Giltigt)	NTC visar signal C_T -värden över 36 för ACTB-målvärdet.
INVALID_CALCULATION (OGILTIG BERÄKNING)	Invalid (Ogiltigt)	Beräkningen för det här målet misslyckades.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (FLERFALDIGT KORSANDE AV TRÖSKELVÄRDE)	Invalid (Ogiltigt)	Förstärkningsgrafen korsar tröskelvärdet mer än en gång. Ett entydigt C_T -värde kan inte bestämmas.
NO_BASELINE (INGEN BASELINE)	Invalid (Ogiltigt)	Inget startvärde för initial baslinje hittades.
NO_CT_DETECTED	Variable (Varierande)	Inget C_T har detekterats för detta mål.
NO_VALUE	Invalid (Ogiltigt)	Målet saknar värde men förväntas ha ett. Detta värde behöver inte ligga inom något speciellt intervall. Det kan vara ett C_T -värde, slutpunktsfluorescensvärde, koncentrationsvärde eller ett beräknat värde (t.ex. genomsnittligt C_T -värde eller ΔC_T -värde).

NORM_FACTOR_ALTERATION	Warning (Varning)	Avvikelse under normaliseringsproceduren. Förstärkningsgrafen visas utan normalisering. Resultat ska tolkas manuellt avseende korrekthet.
OTHER_TARGET_INVALID (ANNAT MÅL OGILTIGT)	Invalid (Ogiltigt)	Ett annat mål för samma prov är ogiltigt.
SATURATION (MÄTTNAD)	Invalid (Ogiltigt)	Rådata för fluorescensen mätas kraftigt innan brytpunkten på förstärkningsgrafen.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warning (Varning)	Rådatafluorescensen mätas i platåfasen på förstärkningsgrafen.
TOPP	Warning (Varning)	En topp i rådatafluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen, men utanför det område där C_T bestäms.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (TOPP NÄRA C_T)	Invalid (Ogiltigt)	En topp har detekterats i förstärkningsgrafen nära C_T -värdet.
STEEP_BASELINE (BRANT BASLINJE)	Invalid (Ogiltigt)	En brant stigande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen.
STRONG_BASELINE_DIP (KRAFTIGT BASLINJEFALL)	Invalid (Ogiltigt)	Ett kraftigt fall i baslinjen för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen.
STRONG_NOISE (HÖGT BRUS)	Invalid (Ogiltigt)	Högt brus utanför tillväxtfasen i förstärkningsgrafen har detekterats.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (HÖGT BRUS I TILLVÄXTFAS)	Invalid (Ogiltigt)	Högt brus har detekterats i tillväxtfasen (exponentiella fasen) i förstärkningsgrafen.
UNCERTAIN	Variable (Varierande)	Resultat från AUDAS är i konflikt med resultat från den centrala analysen. Det går inte att göra en entydig automatisk bedömning av datagiltighet.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable (Varierande)	Ett C_T -värde har detekterats för ett mål som inte ska förstärkas.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Ogiltigt)	Målet har ett värde, men det är inte ett förväntat värde. Det kan vara ett C_T -värde, slutpunktsfluorescensvärde, koncentrationvärde eller ett beräknat värde, t.ex. genomsnittligt C_T -värde eller ΔC_T -värde.
UPSTREAM	Variable (Varierande)	Provstatus angavs som Invalid (Ogiltig) eller Unclear (Otydlig) av en process uppströms (t.ex. från QIAasympny). OBS! För prover som är flaggade som Unclear anges beteendet för Rotor-Gene AssayManager i miljö "Configuration" (Konfiguration) i AssayManager-programvaran. Flaggor som är "Invalid" (Ogiltiga) från uppströmsprocesser leder alltid till ett ogiltigt motsvarande prov i Rotor-Gene AssayManager.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (VÄGLIKNANDE BASLINJE FÖR FLUORESCENS)	Invalid (Ogiltigt)	En vågluknande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafen.

- Om alla kontrollerna i körningen är giltiga kommer Rotor-Gene AssayManager v1.0 att analysera de okända proverna. Det måste finnas en minimal mängd bisulfitkonverterat DNA i provet för att resultaten ska kunna tolkas. Detta indikeras av C_T -värdet för hushållningsgenen ACTB, som måste vara $\leq 26,4$ för att ett prov ska valideras av Rotor-Gene AssayManager.
- $\Delta\Delta C_T$ -värdena för *FAM19A4* och *hsa-mir124-2* beräknas sedan och resultatet presenteras. Om ett $\Delta\Delta C_T$ -värde ligger under cutoff-värdet bedöms målet som "Hypermethylation positive" (hypermetyleringspositivt).
OBS! Nivåer för delvis eller låg metylering är ett naturligt förekommande fenomen som, till skillnad från nivåer för hypermetylering, inte är direkt relaterade till utveckling av cancer.
- Ett prov betraktas som "Hypermethylation positive" (hypermetyleringspositivt) när minst ett av målen bedöms som "Hypermethylation positive" (hypermetyleringspositivt).
- Prover med låg DNA-kvalitet/-kvantitet (dvs. ACTB C_T -värden som ligger precis inom acceptanskriterierna; C_T -värden från 25 till 26,4) kan bedömas som falskt negativa. Vi rekommenderar att PCR-testerna görs om enskilt. Ett negativt resultat för det upprepade testet innebär att provet är hypermetyleringsnegativt, ett positivt resultat innebär att provet är hypermetyleringspositivt.
- Prover med hög cellularitet som bearbetas med ett direktkonverteringsprotokoll riskerar att överbelasta PCR-reaktionen med DNA, vilket kan leda till ett falskt negativt resultat för *FAM19A4*-målet. Därför, för prover med 1) ett negativt hypermetyleringsresultat, 2) ett ACTB C_T värde ≤ 23 , och 3) ett *FAM19A4* $\Delta\Delta C_T$ -värde mellan 10,36 och 11,36, rekommenderas det att upprepa PCR med 5 gånger mindre inmatning av omvandlat DNA genom att späda provet i vatten.

Felsökningshandbok

Den här felsökningshandboken kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan Vanliga frågor (Frequently Asked Questions, FAQ) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vetenskapsmännen på QIAGEN tekniska service svarar gärna på dina frågor om informationen och protokollen i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation finns på baksidan eller på www.qiagen.com).

Information om felsökning gällande Rotor-Gene AssayManager finns i *användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager Core Application*.

Kommentarer och förslag på åtgärd	
Allmän hantering	
DNA-koncentrationen i provet är för låg för att det ska gå att utföra bisulfitkonvertering	
Kontrollera DNA-extraktet	Upprepa DNA-extraktionen med ett kliniskt prov med högre koncentration
Provet bedöms som ogiltigt: amplifieringen av ACTB är för låg eller saknas	
a) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser.	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.
b) Kontrollera DNA-koncentratet.	Öka DNA-inputen för bisulfitkonverteringen till max. Bisulfitkonverteringsreaktionen har en optimal prestanda för DNA-input i området 100 ng–2 µg.
c) Kontrollera det kliniska provet för cellularitet för protokollet "Bisulfitkonvertering direkt på cervixprov".	Upprepa bisulfitkonverteringsreaktionen med 10 % av cervixprovet i PreservCyt-provtagningsmedium (dvs. 2 mL från 20 mL).
d) Kontrollera det bisulfitkonverterade eluatet.	Upprepa bisulfitkonverteringen. En högre DNA-input kan användas om det behövs.
Provet bedöms som ogiltigt: målen FAM19A4 och/eller hsa-mir124-2 är ogiltiga	
Otillräcklig blandning	Blanda prov och reaktionsmix genom att pipettera (ungefär 10 gånger per rör). Upprepa provet.

Kommentarer och förslag på åtgärd

Positiv kontroll bedöms som ogiltig: amplifieringen är för låg eller saknas för ett eller flera av målen

a) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.
b) Partiell försämring	Förvara kitinnehållet i -30 till -15 °C. Undvik att tina och frysa upprepade gånger, maximalt tre cykler.
c) PCR-reagenser delvis försämrade	Förvara kittets innehåll i -30 till -15 °C och håll reaktionsmixarna skyddade mot ljus. Undvik att tina och frysa upprepade gånger.
d) Felvänt rör på remsa	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
e) Utgångsdatum	Kontrollera utgångsdatumet för det använda kitet.
f) Tidsfördröjning mellan pipettering av prover och start av körningen	PCR-reaktionsmixarna kan förvaras i 2–8 °C i 30 minuter i mörker mellan dispensereringen av proverna i PCR-reaktionerna och start av körningen i instrumentet.

Kontroll utan mall (No template control, NTC) är ogiltig

a) Pipetteringsfel	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.
b) Korskontaminering	Byt ut alla kritiska reagenser. Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring (carryover) av kontaminering.
c) Reagenskontaminering	Byt ut alla kritiska reagenser. Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika överföring (carryover) av kontaminering.
d) Felvänt rör på remsa	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
e) Tidsfördröjning mellan pipettering av prover och start av körningen	PCR-reaktionsmixarna kan förvaras i 2–8 °C i 30 minuter i mörker mellan dispensereringen av proverna i PCR-reaktionerna och start av körningen i instrumentet.
f) Sökfragment försämrat	Håll reaktionsmixarna skyddade mot ljus. Leta efter falskt positivt resultat på fluorescenskurvan.

Inga eller låga signaler i prov, men kontrollkörning ok

a) Hämmande effekter	Kontrollera alltid att det inte finns några rester av buffert kvar på filtret efter centrifugeringen under bisulfitkonverteringen. Upprepa bisulfitkonverteringen.
b) Pipetteringsfel	Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.

Kontakta QIAGEN:s tekniska service om problemet kvarstår.

Begränsningar

Reagenserna i QIASure Methylation Test får endast användas för in vitro-diagnostik.

Användning av PCR-tester kräver god laboratoriesed, inklusive underhåll av utrustning, som är speciellt anpassad till molekylärbiologi och som uppfyller tillämpliga regler och relevanta standarder.

Reagenserna och instruktionerna som medföljer detta kit har validerats för optimal prestanda.

QIASure Methylation Test ska användas av professionell laboratoriepersonal som är utbildad i användning av Rotor-Gene Q MDx-instrument och Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Produkten ska endast användas av personal som har fått specialinstruktioner och som har utbildats i teknikerna för real-time PCR och in vitro-diagnostiska förfaranden. Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd.

För optimalt PCR-resultat krävs att anvisningarna i användarmanualen (handboken) följs strikt.

Var uppmärksam på de utgångsdatum som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.

Prover med låg DNA-kvalitet/-kvantitet (dvs. ACTB C_T -värden som ligger precis inom acceptanskriterierna; C_T -värden från 25 till 26,4) kan bedömas som falskt negativa. Vi rekommenderar att testerna görs om enskilt. Ett negativt resultat för det upprepade testet innebär att provet är hypermetyleringsnegativt, ett positivt resultat innebär att provet är hypermetyleringspositivt.

Alla reagenser som medföljer QIASure Methylation Test är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Detta kan annars påverka prestandan.

QIASure Methylation Test är validerat för HPV-positiva kvinnor.

QIASure-metyleringstestet är validerat för cervikala prover som tagits och lagrats i PreservCyt, SurePath™ eller STM-media och för självinsamlade vaginala borstprover som har förvarats i PreservCyt vid ankomst till laboratoriet.

Endast Rotor-Gene Q MDx har validerats för användning med PCR-analysen för QIASure Methylation Test.

All användning av produkten tillsammans med andra märken och/eller ändring av komponenterna gör att garantin för Self-screen B.V. upphör att gälla.

Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i Self-screen-egenskapsstudierna.

Prestandaegenskaper

Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)

Den analytiska sensitiviteten för QIASure Methylation Test fastställdes som den 95-procentiga detektionsgränsen (95 % LOD) genom att använda en seriell spädningsserie med plasmid som innehöll alla tre amplikonsekvenserna (dvs. *ACTB*, *FAM19A4* och *hsa-mir124-2*; intervallet 750 000 till 0,25 kopior per PCR). Den 95-procentiga LOD-gränsen för målen bedömdes som den lägsta plasmidspädningen som gav minst 35 av 36 positiva resultat ($C_T < 40$). Totalt utfördes 12 experiment av fyra olika operatörer (1 körning per operatör och dag) som använde tre olika partier och tre olika RGQ-system. Varje experiment inkluderade testning av 11 plasmidspädningar tre gånger. Den 95-procentiga LOD-gränsen för alla de tre olika målen var 7,5 kopior per PCR.

Linjäritet

Linjäriteten för QIASure-analysen fastställdes med data från de 12 experiment som utfördes för att bedöma den 95-procentiga LOD-gränsen. De två målen, *FAM19A4* och *hsa-mir124-2*, samt referensgenen *ACTB* har linjär amplifiering från 750 000 upp till 7,5 kopior per PCR.

Precision

Precisionen för QIASure Methylation Test fastställdes som intra-analys-variabiliteten (variabilitet för flera resultat för prover med samma koncentration inom ett experiment) och den totala variansen för analysen (variabilitet för flera resultat i analysen som genererades av olika operatörer på olika instrument, med olika satser i olika laboratorier). Testningen utfördes på bisulfitkonverterat DNA som erhållits från ett HPV-positivt högrisk-cervixprov som testats hypermetyleringspositivt med signaler för både *FAM19A4* och *hsa-mir124-2* motsvarande ungefär 3 gånger LOD-koncentrationen. Testningen utfördes i duplikat i 8 körningar av fyra olika operatörer (en körning per operatör och dag) med två olika partier och tre olika RGQ-instrument i två olika laboratorier, vilket gav 16 datapunkter per prov. Variationskoefficienten (CV) bestämdes för C_T - och $\Delta\Delta C_T$ -värdena (tabell 3).

Tabell 3. CV % för CT- och $\Delta\Delta\text{CT}$ -värdena i ett metyleringspositivt cervixprov

	Provtyp	Provtyp (%)	Provtyp (%)
CT-värde	Intern provkvalitetskontroll (dvs. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
$\Delta\Delta\text{CT}$ -värde	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Den totala statistiska spridningen i C_T -värdena för ett prov med den nämnda koncentrationen är 1,32 % för den interna provkvalitetskontrollen (ACTB), 1,52 % för *FAM19A4* och 1,64 % för *hsa-mir124-2*. Den totala statistiska spridningen i $\Delta\Delta\text{C}_\text{T}$ -värden för ett prov med den nämnda koncentrationen är 5,97 % för *FAM19A4* och 5,75 % för *hsa-mir124-2*.

Interfererande ämnen

De hämmande substanser som valdes för sin potentiella effekt på PCR var desulfonerings- och tvättbuffertarna i bisulfitekverteringskitet. Substanser som potentiellt förekommer i det ursprungliga provet testades inte därför att prov-DNA:t renas två gånger med silikonkolor, dvs. DNA-extraktion från det ursprungliga provet och DNA-rening efter bisulfitekverteringen. Spår av desulfonerings- och tvättbufferten visade interferens i PCR:en, vilket detekterades via ett ogiltigt testresultat för den interna provkvalitetskontrollen.

Klinisk prestanda

HPV-positiva cervixprover*

Den kliniska prestandan för QIAzure Methylation Test för cervikal intraepitelial neoplasi grad 3 (CIN 3) och cervixcancer (dvs. CIN 3+) bedömdes i en retrospektiv studie på flera anläggningar inom EU (13). QIAzure Methylation Test utvärderades i 2 384 HPV-positiva cervikala screeningprover av kvinnor (ålder 29–76 år) från fyra EU-länder (Skottland, Slovenien, Danmark, Nederländerna) (13). Prover togs i PreservCyt- eller SurePath-media. Studiepopulationen bestod av 2 012 kvinnor utan tecken på sjukdom inom 2 års uppföljning (förkortat $\leq$ CIN 1), 124 med CIN 2, 228 med CIN 3 och 20 med cancer. DNA extraherades från cervixproverna, och 250 ng DNA användes för input i bisulfitkonverteringsreaktionen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Av 250 ng modifierat DNA användes 20 % i PCR (motsvarande 50 ng ursprungligt mål-DNA/PCR). De totala positivitetsandelarna för positivitetsandelarna för QIAzure Methylation Test, som har stratifierats efter klinisk endpoint, anges nedan (tabell 4).

Tabell 4. Positivitetsandelar för QIAzure Methylation Test

Klinisk endpoint	Fraktion	Positivitetsandel (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)
Livmoderhalscancer	19/20	95,0 % (70,7–99,3)

Bland de HPV-positiva högrisk-cervixproverna är känsligheten för CIN 3+ 78,6 % (195/248; 95 % CI: 73,1–88,3) och den totala specificiteten för QIAzure Methylation Test var 78,3 % (n = 2013; 95 % CI: 76-80). Det negativa prediktiva värdet av hrHPV-positiva, metyleringsnegativa utfall var 99,9 % för livmoderhalscancer (N = 1 694; 95 % CI: 99,6–99,99), 96,9 % för CIN3+ (95 % CI: 96–98), och 93,0 % för CIN2 (95 % CI: 92-94).

* Cervixprover tagna av läkare.

Dessutom utvärderades känsligheten för livmoderhalscancer i en global retrospektiv studie på flera anläggningar studie på 519 invasiva cancerformer med olika histotyper från över 25 länder (11). DNA extraherades från cervixproverna, och 250 ng DNA användes för input i bisulfitkonverteringsreaktionen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Av 250 ng modifierat DNA användes 20 % i PCR (motsvarande 50 ng ursprungligt mål-DNA/PCR). 510 av de 519 cancerformerna testade positivt med testet QIASure Methylation, vilket gav en positivitetsandel på 98,3 % (95 % CI: 96,7–99,2). Positivitetsandelarna positivitetsandelarna som har stratifierats per histotyp anges nedan i Tabell 5. Positivitetsandelar för metyleringstestet QIASure vid livmoderhalscancerprover.

Tabell 5. Positivitetsandelar för metyleringstestet QIASure vid livmoderhalscancerprover

Klinisk endpoint	Fraktion	Positivitetsandel (95 % CI)
Skivepitelcellscarcinom	313/318	98,4 % (96,4-99,5)
Adenocarcinom	121/123	98,4 % (94,2-99,8)
Adenoskvämöst cellkarcinom	42/42	100,0 % (91,6–100)
Sällsynta cancerhistotyper	30/32	93,8 % (79,2–99,2)
Ej specificerad cancerhistotyp	4/4	100 % (39,8–100,0)

HPV-positiva, självtagna vaginala borstprover

Den kliniska prestandan för QIASure Methylation Test för självtagna vaginala borstprover för detektering av cervical intraepithelial neoplasia grad 3 och cervixcancer (dvs. CIN 3+) bedömdes genom att testa 247 HPV-positiva högrisk-vaginalprover. För 14 prover (5,7 %) var ACTB C_T-värdena > 26,4 och bedömdes därför som ogiltiga. Proverna med giltiga testresultat omfattade 148 självtagna borstprover från kvinnor med ≤ CIN 1 efter 18 månaders uppföljning, 24 med CIN 2, 50 med CIN 3, 8 med skivepitelcellscarcinom och 3 med adenocarcinom. DNA extraherades från vaginalproverna, och 250 ng DNA användes för input i bisulfitkonverteringsreaktionen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Av 250 ng bisulfitkonverterat DNA användes 20 % i PCR:en (motsvarande 50 ng ursprungligt mål-DNA/PCR). Positivitetsandelarna för QIASure Methylation Test stratifierat efter klinisk endpoint anges nedan (tabell 6).

Tabell 6. Positivitetsandelar för QIASure Methylation Test vid självtagna vaginala borstprover

Klinisk endpoint	Fraktion	Positivitetsandel (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)
Skivepitelcellscarcinom	8/8	100,0 % (63,1-100,0)
Adenocarcinom	3/3	100,0 % (29,2-100,0)

Bland de HPV-positiva självtagna vaginala högrisk-borstproverna är känsligheten för CIN 3+ 72,1 % (44/61; 95 % CI: 59,7–81,9) och för carcinom 100 % (11/11, 95 % CI: 72–100).*

Prestanda för *FAM19A4* och *hsa-mir124-2* för detektering av avancerade transformerande CIN-lesioner

Analys av promotor-metylering i värdcellen detekterar specifikt så kallade "avancerade" CIN-lesioner, som innehåller en cancerliknande metyleringsprofil och har en förväntat hög risk för att utvecklas till cancer på kort sikt (7, 8). Prestandan för analysen av promotor-hypermetylering av *FAM19A4* och *hsa-mir124-2* bedömdes genom att testa 29 HPV-positiva högriskprover från kvinnor med avancerad transformerande CIN 2/3 och 19 HPV-positiva högriskprover från kvinnor med tidig transformerande CIN 2/3. Metyleringen var framför allt associerad med avancerad sjukdom, med bedömning av alla avancerade CIN 2/3-lesioner (100 %; 29/29; 95 % CI: 88–100) hypermetyleringspositiva, jämfört med 47 % (9/19; 95 % CI: 27–69) av de tidiga CIN 2/3-lesionerna.

* Anmärkning: Hypermetylering av målen i prover från kvinnor som innehöll avancerad CIN-lesion och/eller cervixcancer kan undgå att detekteras på grund av variabilitet vid provtagningen, till exempel som ett resultat av bristfällig provtagning.

Robusthet

Robustheten för QIASure Methylation Test bestämdes som överensstämmelsen mellan outputen för QIASure Methylation Test jämfört med RUO-versionen (Research Use Only) av analysen. Testningen utfördes på bisulfitkonverterat genomiskt DNA som erhållits från 10 HPV-positiva högrisk-cervixprover, varav 5 tidigare hade identifierats som hypermetyleringsnegativa för båda markörerna och 5 som metyleringspositiva (t.ex. för minst en av de 2 markörerna). Testningen utfördes i duplikat i 8 körningar av fyra olika operatörer (en körning per operatör och dag) med två olika partier och tre olika Rotor-Gene Q MDx-instrument, utfört i två olika laboratorier. Totalt gav detta 16 datapunkter per prov (tabell 7).

Tabell 7. Överensstämmelse för QIASure Methylation Test jämfört med RUO-versionen av analysen

Provnummer	RUO-resultat	Överensstämmelse för labb 1 jämfört med RUO	Överensstämmelse för labb 2 jämfört 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)
Delsumma		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)
Delsumma		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Fyra av de fem proverna som tidigare hade identifierats som metyleringsnegativa visade 100 % överensstämmelse vid användning av QIASure Methylation Test i båda laboratorierna. Prov 3 visade en överensstämmelse på 62,5 % (5/8) i båda laboratorierna. Den observerade variationen relaterade till *FAM19A4* med nivåer kring analysens cutoff-värde. Den totala överensstämmelsen hos de metyleringsnegativa proverna var 92,5 % (37/40).

Alla de 5 prover som tidigare hade identifierats som metyleringspositiva visade 100 % överensstämmelse med referensanalysen, vilket gjorde att den totala överensstämmelsen var 100 % (40/40).

Bisulfitkonvertering direkt på cervixprover

Protokollet "Bisulfitkonvertering direkt på cervixprover med användning av EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit" verifierades mot referensprotokollet (dvs. bisulfitkonvertering med tidigare DNA-provkvantitetskontroll) på 119 cervixskrapningar följt av QIASure Methylation Test. Andelen framgångsrik bisulfitkonvertering direkt på cervixprover med 2,5 % indata från cervixprov var 95,8 % (114/119) och ökade till 100 % efter omtestning av de ogiltiga med 10 % indata från cervixprov. Överensstämmelsen i QIASure Methylation Test-resultatet mellan bisulfitkonverteringsprotokollen var 90,8 % (108/119; kappavärde 0,75).

Protokollet "Bisulfitkonvertering direkt på cervixprover med användning av QIAAsymphony Bisulfite Kit" verifierades mot referensprotokollet (dvs. bisulfitkonvertering med tidigare DNA-provkvantitetskontroll) på 120 cervixskrapningar följt av QIASure Methylation Test. Andelen framgångsrik bisulfitkonvertering direkt på cervixprover med 2,5 % indata från cervixprov var 94,2 % (113/120) jämfört med 97,5 % (117/120) med referensprotokollet. Överensstämmelsen i QIASure Methylation Test-resultatet mellan bisulfitkonverteringsprotokollen var 94,7 % (107/113; kappavärde 0,88).

Referenser

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

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Symbol för CE-IVD-märkning
 <N>	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen (handboken) och n är revisionsnumret
	GTIN-artikelnnummer (Global Trade Item Number)
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare



Skyddas mot ljus



Se bruksanvisningen



Iakttag försiktighet

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800- 22- 44- 6000 eller kontakta QIAGEN teknisk service eller en lokal distributör (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
QIASure Methylation Test Kit	För 72 reaktioner: 2 masterblandningar, 2 kalibratorer.	616014
QIASymphony SP	QIASymphony provberedningsmodul: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete (valfritt för automatisk extraktion)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykler och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, men installation och utbildning ingår inte	9002032

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Tillbehör till Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 mL rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106
Rotor-Gene AssayManager – för rutintestning med Rotor-Gene Q MDx-instrument		
Rotor-Gene AssayManager	Programvara för rutintestning i kombination med Rotor-Gene Q- och QIAasymphony RGQ-instrument; engångslicensierad programvara för installation på en enda dator	9022739

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN kit-handbok eller bruksanvisning. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-satsen finns tillgängliga på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.

Denna sida är avsiktligt tom.

Dokumentrevisioner

Datum	Ändringar
R4, juni 2019	Reviderat arbetsflöde för proceduren med flödesschema i Princip och utförande; tillagt EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit i Material som behövs men inte medföljer; Reviderat innehåll i Säkerhetsinformationen; Tillagd information om uppvärmningskörning för RGQ MDx 5-plex HRM; Reviderat avsnitt om provberedning; Tillagt felsökningsobjekt; Ämnet bisulfitkonvertering direkt på cervixprover tillagt i Prestandaegenskaper; Uppdaterat referensavsnitt; Layoutuppdateringar
R5 juli 2023	Tillagd QIAsymphony-instrumentering för valfri automatiserad extraktion och kittet QIAsymphony Bisulfite i material som krävs men inte medföljer; Reviderad provberedningssektion; Lade till användningen av SurePath-provtagningsmedium; Reviderade avsnittet om klinisk prestanda. Lade till rubriker för tabell 5 och tabell 6.

Avtal om begränsad licens för QIASure Methylation Test

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och denna handbok och får endast användas med komponenterna som ingår i satsen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit, förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Inköparen och användaren av denna sats samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende satsen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com

Self-screen B.V. är den juridiska tillverkaren av QIASure Methylation Test.

QIASure Methylation Test tillverkas av Self-screen B.V. och distribueras av QIAGEN i Europa.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAsymphony®, *digene*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); BD®, SurePath® (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyte® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.). Registrerade namn, varumärken med mera som används i detta dokument ska inte anses som oskyddade enligt lag även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

07-2023 HB-2304-005 1132288SV © 2023 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com