

Temmuz 2023

QIASure™ Methylation Test Kullanım Talimatları (El Kitabı)



Sürüm 1

Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM cihazı ile kullanım içindir



616014

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

1132288TR

İçerik

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama	5
Prosedür Prensipleri	5
Sağlanan Materyaller	7
Kit İçeriği	7
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller	7
Uyarılar ve Önlemler	10
Güvenlik bilgileri	10
Genel önlemler	10
AssayManager profil önlemleri	12
Reaktif Saklama ve Kullanma	13
Numune Kullanımı ve Saklama	14
PreservCyt içinde saklanan örnekler için Örnek Hazırlama	16
SurePath™ içinde saklanan örnekler için Örnek Hazırlama	19
Bisülfid dönüşümü için genel öneriler	20
Protokol: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında QIASure Methylation Test PCR'si	21
Sonuçların Yorumlanması	34
Sorun Giderme Kılavuzu	38
Sınırlamalar	40
Performans Özellikleri	42
Tespit Sınırı (Limit Of Detection, LOD)	42
Doğrusallık	42

Hassasiyet.....	42
Olumsuz etkileyen maddeler	43
Klinik Performans	44
Güçlülük	47
Referanslar	50
Semboller	52
İletişim Bilgileri.....	53
Sipariş Bilgileri.....	54
Belge Revizyon Geçmişi.....	57

Kullanım Amacı

QIASure Methylation Test (kat. no. 616014), *FAM19A4* ve *hsa-mir124-2* genlerinin promotör hipermetilasyonunun tespit edilmesine yönelik olan, çoklu, gerçek zamanlı, metilasyona özgü bir PCR tahlilidir. QIASure Methylation Test ile test edilebilecek örnekler arasında, aşağıdaki yöntemlerle toplanan numunelerden izole edilen bisüfit dönüştürülmüş DNA yer alır:

- *Digene*® HC2 DNA Collection Device ile toplanan servikal numuneler (doktor tarafından toplanır)
- Fırça/süpürge tipi bir toplama cihazı kullanılarak toplanan ve PreservCyt® Solution veya SurePath™ Solution içine konan servikal numuneler (doktor tarafından toplanır)
- Fırça/süpürge tipi bir cihaz kullanılarak toplanan vajinal numuneler (kendi kendine toplanır)

Kullanım endikasyonları:

1. İnsan papilloma virüsü (human papillomavirus, HPV) test sonucu pozitif olan kadınlarda, kolposkopiye veya diğer takip prosedürlerine sevk gerekliliğini belirleme amaçlı bir takip testi olarak.
2. Pap testi sonuçlarında önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücreler (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US) görülen kadınlarda, kolposkopiye veya diğer takip prosedürlerine sevk gerekliliğini belirleme amaçlı bir takip testi olarak.

Bu ürün, in vitro tanı amaçlı prosedürler, moleküler biyoloji teknikleri ve Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sistemi konusunda eğitilmiş teknisyenler ve laborantlar gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

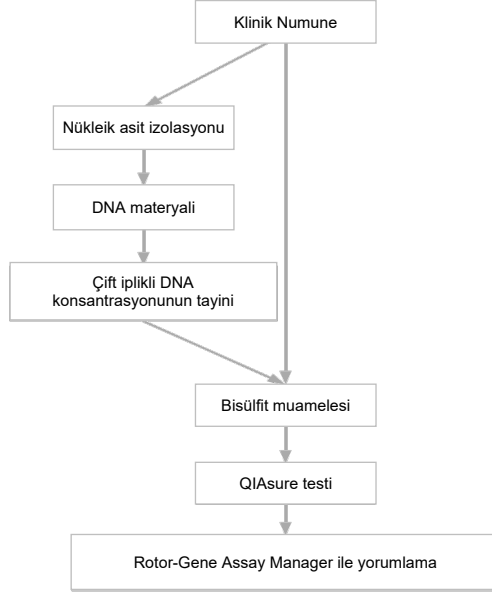
Özet ve Açıklama

DNA metilasyonu, gelişmiş organizmalarda normal gelişim için önemli olan biyokimyasal bir süreçtir (1). Sitozin nükleotidinin pirimidin halkasının 5. pozisyonuna bir metil grubu eklenmesini içerir. Anormal DNA metilasyonu örüntüleri, karsinogenezde de önemli bir rol oynar. Servikal kanser ve endometriyal kanser dahil olmak üzere çeşitli insan kanserleri ve kanser hücresi hatlarında, *FAM19A4* (Sekans benzerliği olan ailenin 19 (kemokin (C-C motifi) benzeri) üyesi A4) ve/veya *hsa-mir124-2* (*homo sapiens mikro RNA 124-2*) genlerinin promotör hipermetilasyonu tespit edilmiştir (2–6). Konak hücre promotör metilasyon analizi, spesifik olarak kanserleri ve kanser benzeri bir metilasyon profili barındıran ve kısa vadede kansere ilerleme riski yüksek olan, "ileri" servikal intraepitelyal neoplazi (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) lezyonları adlı lezyonları tespit etmektedir (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). QIASure tahlili, dahili örnek kalite kontrolü olarak ACTB (insan β -aktin geni) kullanılarak, servikal veya vajinal numunelerden izole edilmiş bisülfid dönüştürülmüş DNA'da bulunan *FAM19A4* ve *hsa-mir124-2* genlerinin promotör hipermetilasyonunun tespitini sağlar.

Prosedür Prensipleri

QIASure Methylation Test, *FAM19A4* ve *hsa-mir124-2* tümör baskılayıcı genlerinin metile edilen promotör bölgelerinin yanı sıra, bir referans genin metilasyona özgü olmayan bir kısmını amplifiye eden, çoklu real-time PCR testidir. Kit içinde 2 tüp QIASure Master Mix ve 2 tüp QIASure Calibrator bulunur. Master karışım, klinik numunelerden hazırlanan bisülfid dönüştürülmüş DNA'nın amplifikasyonuna yöneliktir. Master karışım, dahili örnek kalite kontrolü görevi gören hedef genlerin ve referans genin primerlerini ve problemlerini içerir. Kalibratör, *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* ve ACTB ampikonlarının sekanslarını içeren, linearize bir plazmidir.

İş akışı prosedürü



QIASure tahlili Rotor-Gene Q MDx cihazında çalışır ve Rotor-Gene AssayManager® yazılımı, veri analizi ve yorumlamasını otomatik olarak gerçekleştirir. C_T değeri (döngü eşiği), bir arka plan sinyalinin üzerindeki bir floresan sinyalinin tespit edilmesi için gerekli PCR döngüsü sayısını temsil eder ve bu sayı, örnekteki mevcut hedef molekül sayısı ile korele edilir. QIASure tahlili ΔC_T değerini, *FAM19A4* veya *hsa-mir124-2* hedefinin C_T değeri ile referansın (ACTB) C_T değeri arasındaki fark olarak hesaplar. Bu ΔC_T değeri, *FAM19A4* veya *hsa-mir124-2* geninin promotör metilasyon seviyesinin bağlı kantitatif değeridir. Normalizasyon amacıyla, bir kalibratör örneğinin ΔC_T değeri, *FAM19A4* veya *hsa-mir124-2* hedefinin ΔC_T değerinden çıkartılır ve $\Delta \Delta C_T$ değeri elde edilir (9). Kalibratör, üç hedefin (*FAM19A4*, *hsa-mir124-2* ve ACTB) bilinen sayıda kopyasına sahip, standardize bir düşük kopyalı plazmid DNA örneğidir.

Sağlanan Materyaller

Kit İçeriği

QIASure Methylation Test		72
Katalog no.		616014
Reaksiyon sayısı		72
QIASure Master Mix (2 tüp)	Kahverengi tüp	630 µL
QIASure Calibrator (2 tüp)	Şeffaf renkli tüp	25 µL
QIASure Methylation Test Kullanım Talimatları (El Kitabı)		1

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallar ile çalışırken daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden temin edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun.

Kendi kendine toplanan örnekler için örnek hazırlamaya yönelik sarf malzemeleri ve reaktifler

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

SurePath toplama ortamında saklanan örnek hazırlama reaktifleri.

- Buffer AL (QIAGEN katalog numarası: 19075)

Bisülfıt dönüşümüne yönelik sarf malzemeleri ve reaktifler

Doğrulanmış bisülfıt dönüşümü kitleri içinde aşağıdakiler yer alır:

- EZ DNA Methylation Kit (ZYMO Research, kat. no. D5001 veya kat. no. D5002)
- EZ DNA Methylation-Lighting (ZYMO Research, kat. no. D5030 veya kat. no. D5031)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat. no. 59720)
- QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN kat. no. 931106)

Rotor-Gene Q MDx cihazı sarf malzemeleri

- Strip tubes and Caps, 0.1 mL (kat. no. 981103)
- Safılaştırılmış su (örn. moleküler biyoloji sınıfı, distile veya deiyonize)

Ekipman

- PCR için özel ayarlanabilir pipetler* (1-10 µL; 10-100 µL)
- Tek kullanımlık eldiven
- >10.000 rpm hızda masaüstü santrifüj*
- Vorteks karıştırıcı*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, kat. no. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, kat. no. ND-3300) veya muadili
- İsteğe bağılı otomatik ekstraksiyon ve/veya bisülfıt dönüşümü için QIASymphony SP System (kat. no. 9001297)

* Cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

Real-time PCR için ekipmanlar

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (kat. no. 9002033) veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı (kat. no. 9002032)*
- Rotor-Gene AssayManager Core Application yazılım sürümü 1.0.x (burada x 4'e eşit veya 4'ün üzerindedir)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in kurulu, sürüm 1.0.x (burada x 1'e eşit veya 1'in üzerindedir)
- Doktor tarafından toplanan servikal numunelerden elde edilen bisülfıt dönüştürülmüş DNA üzerinde uygulamak üzere QIASure Assay Profile (AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap dosyasından) (Y 1'e eşit veya 1'den büyüktür)
- Hasta tarafından toplanan vajinal fırça numunelerinden elde edilen bisülfıt dönüştürülmüş DNA üzerinde uygulamak üzere QIASure hasta tarafından toplanan fırça numunesi Tahlil Profili (AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap dosyasından) (Y 0'a eşit veya 0'dan büyüktür)

* Ocak 2010 veya daha sonra üretilmiş Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazı. Üretim tarihi bilgisi, cihazın arkasındaki seri numarasından elde edilebilir. Seri numarası, "aa" ibaresinin basamak olarak üretim ayını, "yy" ibaresinin üretim yılının son iki basamağını ve "nnn" ibaresinin benzersiz cihaz tanımlayıcıyı gösterdiği "aayynnn" biçimindedir.

Uyarılar ve Önlemler

Sadece in vitro tanı amaçlı kullanım içindir.

Güvenlik bilgileri

Kimyasallar ile çalışırken daima uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN® kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

QIASURE MASTER MIX



İçerik: 1,2,4-triazol: Tehlike! Doğurganlığa veya anne karnındaki bebeğe zarar verdiğiinden şüphelenilmektedir. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın.

Genel önlemler

PCR testlerinin kullanımı ekipmanların bakımı dahil olmak üzere, moleküler biyolojiye özel ve yürürlükteki yönetmeliklere ve ilgili standartlara uygun iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

Her zaman aşağıdakilere dikkat edin:

- Numuneleri kullanırken koruyucu tek kullanımlık pudrasız eldivenler, bir laboratuvar önlüğü ve göz koruması kullanın.

- Numune ve kitin mikrobiyal ve nükleaz (DNaz) kontaminasyonunu engelleyin. DNaz, DNA şablonunun bozunmasına yol açabilir.
- Yanlış pozitif sinyalle sonuçlanabilecek DNA veya PCR ürünü taşınmasından kaynaklı kontaminasyonu önleyin.
- Daima aerosol bariyerli, DNaz içermeyen tek kullanımlık pipet uçları kullanın.
- QIASure tahlilinin reaktifleri optimum ölçüde seyreltilir. Performans kaybı yaşanabileceği için reaktifleri daha fazla seyreltmeyin.
- QIASure kit içinde tedarik edilmiş tüm reaktifler, yalnızca aynı kit içinde tedarik edilen reaktiflerle birlikte kullanıma yöneliktir. Performans etkilenebileceği için bir kitteki herhangi bir reaktifin yerine, aynı lottan olsalar dahi başka bir QIASure kitinin reaktifini kullanmayın.
- İlave uyarılar, önlemler ve prosedürler için Rotor-Gene Q MDx cihazı kullanım kılavuzuna bakın.
- Günün ilk çalışmasından önce, Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM için 95 °C'de 10 dakikalık bir ısınma çalışması gerçekleştirin.
- İnkübasyon sürelerinin ve sıcaklıkların değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilere neden olabilir.
- Son kullanma tarihi geçmiş veya yanlış şekilde saklanmış kit bileşenlerini kullanmayın.
- Bileşenlerin ışığa maruz kalmasını en aza indirin; reaksiyon karışımları maruz kalma sonucu değişebilir.
- Karışımların PCR reaktifleri içinde bulunan sentetik maddelerle kontamine olmasını önlemek için çok dikkatli olun.
- Örneği ve tahlil atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.

AssayManager profil önlemleri

Farklı örnek tipleri için farklı AssayManager profilleri gereklidir. Test edilecek örnek tipi için, aşağıda belirtildiği şekilde doğru profilin kullanıldığından emin olun:

- Doktor tarafından toplanan servikal numunelerden elde edilen bisülfid dönüştürülmüş DNA'nın test edilmesi için "QIASure servikal kazıntı Tahlil Profili (AP_ QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap dosyasından)" kullanılmalıdır
- Hasta tarafından toplanan vajinal fırça numunelerinden elde edilen bisülfid dönüştürülmüş DNA'nın test edilmesi için "QIASure hasta tarafından toplanan fırça numunesi Tahlil Profili (AP_ QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap dosyasından)" kullanılmalıdır

Reaktif Saklama ve Kullanma

Nakliye koşulları

QIASure Methylation Test kuru buz üzerinde gönderilir. Teslimat esnasında QIASure Methylation Test'in herhangi bir bileşeninin donmuş olmadığını, dış ambalajın nakliye esnasında açılmış olduğunu veya paket içinde ambalaj notu, el kitabı veya reaktiflerin bulunmadığını fark ederseniz lütfen QIAGEN Teknik Servis Departmanları veya yerel distribütörlerle iletişime geçin (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Saklama koşulları

QIASure Methylation Test, teslim alınmasından hemen sonra -30 ile -15 °C arasında sabit sıcaklıklı bir dondurucuda saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır.

Stabilite

QIASure Methylation Test, belirtilen saklama koşullarında saklandığı zaman kutu etiketinde belirtilen son kullanma tarihine kadar stabil kalır.

Açıldıktan sonra, reaktifler -30 ila -15°C sıcaklıkta, orijinal ambalajları içinde saklanabilir. Tekrarlanan çözündürme ve dondurma işlemlerinden kaçınılmalıdır. En fazla 3 kez çözündürüp dondurmanız tavsiye edilir.

- Tüpü 10 defa ters çevirerek hafifçe karıştırın ve tüm tüpleri açmadan önce santrifüjleyin.
- Her reaktif için son kullanma tarihleri ayrı bileşen etiketlerinde belirtilmiştir. Doğru saklama koşulları altında, aynı bileşen lotları kullanıldığı sürece ürün stabilite süresi boyunca performansını koruyacaktır.

Numune Kullanımı ve Saklama

DİKKAT



Tüm numunelere enfeksiyöz olabilecek materyal gibi muamele edilmelidir.

Servikal numuneler

QIASure kiti, servikal numunelerden elde edilen bisülfid dönüştürülmüş genomik DNA örnekleriyle kullanıma yöneliktir. Servikal numuneler (kazıntılar) için onaylanan toplama ortamları, PreservCyt® toplama ortamı, SurePath™ toplama ortamı ve *Digene* Specimen Transport Medium'dur (STM). Klinik örneklerin optimum saklama sıcaklığı laboratuvara gelişten itibaren 2-8 °C'dir. Bu saklama koşullarında, PreservCyt veya SurePath™ toplama ortamındaki örnekler DNA ekstraksiyonundan önce 3 ay stabil kalır.

Not: STM içindeki servikal örnekler, test laboratuvarına gece teslimatı için 2-30 °C'de gönderilebilir ve alındıktan sonra tekrar -20 °C'de dondurulabilir.

Hasta tarafından toplanan vajinal fırça numuneleri

QIASure Methylation Test, hasta tarafından toplanan vajinal fırça numunelerinden ekstrakte edilen bisülfid dönüştürülmüş genomik DNA örnekleriyle kullanıma yöneliktir. Kendi kendine toplanan vajinal fırça numuneleri, kuru şekilde toplanıp gönderilebilir ve laboratuvara teslim edildikten sonra 2-3 mL'lik önerilen bir saklama hacmi ile PreservCyt toplama ortamında saklanabilir. PreservCyt toplama ortamındaki örnekler 2-8 °C'de veya oda sıcaklığında en fazla 3 ay saklanabilir.

Genomik DNA örnekleri

Genomik DNA ekstrakte edildikten sonra, DNA örnekleri -30 °C ile -15 °C arasında 12 aya kadar saklanabilir ve gönderilebilir.

PreservCyt içinde saklanan örnekler için Örnek Hazırlama

QIASure Methylation Test, servikal numunelerden elde edilen bisülfite dönüştürülmüş genomik DNA örnekleriyle kullanım için onaylanmıştır. Genomik DNA'nın bisülfite dönüşümü şu şekilde gerçekleştirilebilir:

- i) önceden örnek DNA ekstraksiyonu ve DNA kalite kontrolü ile veya
- ii) doğrudan EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat. no. 59720) kullanılarak servikal numune üzerinde veya
- iii) doğrudan QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN kat.no. 931106) kullanılarak servikal numune üzerinde.

Önerimiz aşağıda açıklanmaktadır.

- i) Önceden DNA ekstraksiyonu ve DNA kalite kontrolü ile bisülfite dönüşümü
Bu protokol; DNA Ekstraksiyonunu, DNA konsantrasyonunun ölçümünü ve ardından, bisülfite dönüşüm protokolüne başlamadan önce optimum elüat hacminin alikotunun oluşturulmasını gerektirir ve ZYMO Research EZ DNA Methylation™ Kit (kat. no. D5001) ve EZ DNA Methylation-Lightning Kit (kat. no. D5030) ürünü için doğrulanmıştır. Aşağıdaki yöntemleri öneririz:
 - DNA ekstraksiyonu
Standart DNA ekstraksiyon kitleri (örn. kolon temelli ve manyetik boncuk temelli kitler) QIASure Methylation Test ile uyumludur.
 - DNA konsantrasyonunun ölçümü
DNA'nın bisülfite dönüşümünden önce DNA konsantrasyonunu ölçün. DNA konsantrasyonunun ölçümü için uygun sistemler, Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (her ikisi de Thermo Fisher Scientific firmasıdır) veya muadilleridir.

○ DNA elüatının alikotunu oluşturma

Bisülfid dönüşüm aralıkları için optimum DNA girdisi 100 ng - 2 µg arasında değişmekte olup bisülfid dönüşümü için 200 ng önerilir. DNA konsantrasyonunun bisülfid dönüşümü için çok düşük olması durumunda DNA ekstraksiyonunu, daha yüksek girdi hacminde klinik örneklerle tekrarlayın veya daha küçük bir elüsyon hacminde DNA'nın elüsyonunu yapın.

○ EZ DNA Methylation Kit ve EZ DNA Methylation-Lightning Kit ile bisülfid dönüşümü, üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilir.

Not: EZ DNA Methylation Kit'e göre, yeterince yüksek bir dönüşüm verimi (>%98) elde etmek için örnek DNA'sının maksimum miktarı 2 µg'ı aşmamalıdır.

● ii) EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit ile doğrudan servikal numune üzerinde bisülfid dönüşümü

Doğrudan, PreservCyt® Solution içinde toplanan servikal numune üzerinde gerçekleştirilen bisülfid dönüşümü, QIAGEN'in EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit ürünü için doğrulanmıştır. Yüksek konsantrasyonlu DNA örnekleri (1 ng - 2 µg) için üreticinin önerileri doğrultusunda, aşağıdaki öğeler hariç olmak üzere, *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion El Kitabı* belgesine başvuruyoruz:

- Protokolün 1. Adımı. PreservCyt® toplama ortamındaki servikal numunenin %2,5'ini (20 mL'nin 500 µL'si) alın ve minimum 3390 x g hızda 10 dakika santrifüjleyerek pelet haline getirin. Hücre peletinden ayrılan süpernatanı maksimum 20 µL PreservCyt toplama ortamına atın. Bisülfid dönüşüm reaksiyonu için bu hücre peleti örneğini kullanın ve üretici protokolünün 2. adımıyla devam edin.
- Buffer BL: Taşıyıcı RNA eklemeyin.
- Bisülfid dönüşüm DNA'sının elüsyon hacmi, her bir örnek için Buffer EB'nin 50 µL'sidir.

● *iii) Doğrudan, QIAAsymphony Bisulfite Kit ile servikal numune üzerinde bisülfıt dönüşümü*

Doğrudan, PreservCyt® Solution içinde toplanan servikal numune üzerinde gerçekleştirilen bisülfıt dönüşümü, QIAGEN'in QIAAsymphony Bisulfite kiti için doğrulanmıştır. QIAAsymphony Bisulfite kiti el kitabına başvuruyoruz, aynı zamanda test, üretici önerilerine göre gerçekleştirilmektedir.

- PreservCyt® toplama ortamındaki servikal numunenin %2,5'ini (20 mL'nin 500 µL'si) alın ve minimum 3390 x g hızda 10 dakika santrifüjleyerek pelet haline getirin. Hücre peletinden ayrılan süpernatanı maksimum 20 µL artık PreservCyt toplama ortamına atın.
- Bisülfıt dönüşüm reaksiyonu için hücre peletini kullanan DNA yerine adım 2'den başlayarak "QIAAsymphony SP protokol sayfasını – Bisülfıt 140_HC_V" takip edin.
- Bisülfıt dönüşüm reaksiyonu tamamlandıktan sonra QIAAsymphony Bisulfite Kit el kitabındaki "Farklı örnek türlerinde metillenmemiş Sitozinlerin bisülfıt dönüşümü" protokolündeki adımları takip ederek QIAAsymphony üzerinde bir SP çalışması başlatın. Elüsyon 40 µL içinde yapılır.

SurePath™ içinde saklanan örnekler için Örnek Hazırlama

SurePath içinde saklanan örneklerin DNA ekstraksiyonundan önce ön işleme tabi tutulması gerekir. QIASure Methylation Test, aşağıda açıklanan prosedüre göre servikal numunelerden elde edilen bisülfite dönüştürülmüş genomik DNA örnekleriyle kullanım için onaylanmıştır.

- Servikal örneğin %2,5'ini alın.
- 4000 g'de 10 dakika santrifüjleyin, süpernatanı çıkarın ancak 100 µL SurePath™ kalsın.
- 100 µL Buffer AL ekleyin ve peleti yeniden süspanse edin
- İyi karıştırın ve 90 °C'de 20 dakika inkübe edin
- Oda sıcaklığında 5 dakika soğutun.
- DNA ekstraksiyonunu QIAamp DNA mini kit (veya muadili) kullanarak üretici talimatına göre gerçekleştirin, 50 µL içinde DNA elüsyonu yapın.
- DNA konsantrasyonunun ölçümü için uygun sistemler, Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectromete (her ikisi de Thermo Fisher Scientific firmasıdır) veya muadilleridir.
- Bisülfite dönüşümü için 200 ng DNA önerilir, 200 ng mevcut değilse maksimum giriş hacmini kullanın. Dönüşümü EZ DNA methylation kit veya EZ DNA Methylation-Lightning kit (Zymo) ile üretici talimatlarına göre gerçekleştirin. QIASure Methylation Test için 2,5 µL elüat kullanın.

Bisülfıt dönüşümü için genel öneriler

Bisülfıt dönüşüm reaksiyonu, reaktiflerin kontaminasyonunu önlemek adına, QIASure Master Mix'in saklandığı ve dağıtıldığı alandan ayrı, özel bir alanda gerçekleştirilmelidir.

QIASure reaksiyonunun girdisi, 2,5 µL bisülfıt dönüştürülmüş DNA'dır.

Dahili örnek kalite kontrolü negatifse (ACTB C_T değerleri >26,4 ise) numune bisülfıt dönüştürülmüş DNA hazırlığı, materyal miktarı ve/veya kalitesinin yetersiz olması ve geçersiz olarak skorlanmasıyla sonuçlanır. Aşağıdakiler için geçerli aralıkta bir ACTB C_T değerine ulaşmak için önerilen adımları uygulayın:

- Önceden DNA ekstraksiyonu ve DNA miktar kontrolü ile bisülfıt dönüşümü: Bisülfıt dönüşüm reaksiyonunu, daha yüksek örnek DNA girdisiyle tekrarlayın ve/veya DNA izolasyonunu daha yüksek servikal numune girdisiyle tekrarlayın
- Doğrudan servikal numune üzerinde bisülfıt dönüşümü: Bisülfıt dönüşüm reaksiyonunu, PreservCyt toplama ortamındaki servikal numunenin %10'u* (20 ml'nin 2 mL'si) ile tekrarlayın.

Bisülfıt dönüştürülmüş DNA, 2–8°C'de 24 saate kadar, –25 ila –15°C'de 5 güne kadar ve –70°C'nin altında 3 aya kadar saklanabilir. Bisülfıt dönüştürülmüş DNA'nın tekrar tekrar dondurulup çözündürülmesinden her zaman kaçınılmalıdır. Dondurma-çözdürme döngülerinin sayısı, yeterli kalite elde etmek adına üçü aşmamalıdır.

* Doğrudan bisülfıt dönüşümü için örnek hacmi, örnek alım değişkenliği nedeniyle başarı oranının yetersiz olması durumunda (örneğin, yetersiz örnek alımı sonucu) artırılabilir.

Protokol: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında QIASure Methylation Test PCR'si*

Başlamadan önce önemli noktalar

- Protokole başlamadan önce Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı hakkında bilgi edinin. Cihazın (Kat. no. 9002033 veya 9002032) kullanım kılavuzuna bakın.
- Günün ilk çalışmasından önce, Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM için 95 °C'de 10 dakikalık bir ısınma çalışması gerçekleştirin.
- Rotor-Gene AssayManager v1.0, PCR sonuçlarının otomatik yorumlanmasını sağlar. QIASure kiti, Rotor-Gene Q MDx cihazında, Rotor-Gene AssayManager v1.0 kullanılarak çalıştırılmalıdır. Rotor-Gene AssayManager v1.0 (Kat. no. 9022739) ve Epsilon Plug-In hakkında bilgi edinin ve her ikisi için de kullanım kılavuzlarına bakın.
- Farklı örnek tipleri için farklı Rotor-Gene AssayManager v1.0 Assay Profile'lar (Tahlil Profili) gereklidir. Test edilecek örnek tipi için, aşağıda belirtildiği şekilde doğru profilin kullanıldığından emin olun:
 - Doktor tarafından toplanan servikal numunelerden elde edilen bisülfite dönüştürülmüş DNA'nın test edilmesi için "QIASure servikal kazıntı Tahlil Profili (AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap dosyasından)" kullanılmalıdır
 - Hasta tarafından toplanan vajinal fırça numunelerinden elde edilen bisülfite dönüştürülmüş DNA'nın test edilmesi için "QIASure hasta tarafından toplanan fırça numunesi Tahlil Profili (AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap dosyasından)" kullanılmalıdır

* Ocak 2010 veya daha sonra üretilmiş Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazı. Üretim tarihi bilgisi, cihazın arkasındaki seri numarasından elde edilebilir. Seri numarası, "aa" ibaresinin basamak olarak üretim ayını, "yy" ibaresinin üretim yılının son iki basamağını ve "nnn" ibaresinin benzersiz cihaz tanımlayıcıyı gösterdiği "aayynnn" biçimindedir.

Not: Deney başına yalnızca bir örnek tipi test edilebilir. Her bir örnek tipi için ayrı tahlil profilleri optimize edilmiştir ve müşterilerin, her bir spesifik örnek tipi için optimum sonuçları elde etmek adına doğru Tahlil Profilini seçmesi önemlidir.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Rotor-Gene Q MDx cihazına bağlı bilgisayara Rotor-Gene AssayManager yazılım sürümü v1.0.x (burada x 4'e eşit veya 4'ün üzerindedir) kurulmalıdır. Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application yazılımının kurulumu hakkında ayrıntılar için *Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application Kullanım Kılavuzu* belgesine bakın.
 - QIASure Methylation Test, "Epsilon Plug-in" adlı özel bir eklenti gerektirir (sürüm 1.0.1 veya üzeri). Bu eklenti QIAGEN web sayfasından indirilebilir:
<http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Bu eklenti, halihazırda Rotor-Gene AssayManager sürümü 1.0.x'in (burada x 4'e eşit veya 4'ün üzerindedir) kurulu olduğu bir bilgisayara kurulmalıdır.
 - QIASure Methylation Test, Rotor-Gene AssayManager v1.0 yazılımı ile çalıştırılacak tahlile özgü bir profil gerektirir. Bu Assay Profile (Tahlil Profili), deneyde döngüleme ve analiz için gereken tüm parametreleri içerir. 2 QIASure Assay Profile bulunur:
 - "QIASure servikal kazıntı" Tahlil Profili (AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap dosyasından), doktor tarafından toplanan servikal numunelere karşılık gelir
 - "QIASure hasta tarafından toplanan fırça numunesi" Tahlil Profili (AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap), hasta tarafından toplanan vajinal fırça numunelerine karşılık gelir. Profiller, QIASure Methylation Test web sayfasından indirilebilir: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Tahlil Profili, Rotor-Gene AssayManager yazılımına aktarılmalıdır.
- Not: QIASure kiti, yalnızca Rotor-Gene AssayManager v1.0 yazılımında belirli yapılandırma ayarları programlanmışsa çalıştırılabilir.

Sistem genelinde proses güvenliği için aşağıdaki yapılandırma ayarlarının kapalı mod için ayarlanması şarttır:

- "Material number required" (Materyal numarası gerekli)
- "Valid expiry date required" (Geçerli son kullanma tarihi gerekli)
- "Lot number required" (Lot numarası gerekli)

Epsilon Plug-in kurulumu ve tahlil profilinin ie aktarımı

Epsilon Plug-in ve tahlil profilinin kurulumu ve ie aktarımı, *Rotor-Gene AssayManager Core Application Kullanım Kılavuzu* ve *Epsilon Plug-In Kullanım Kılavuzu* belgelerinde ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

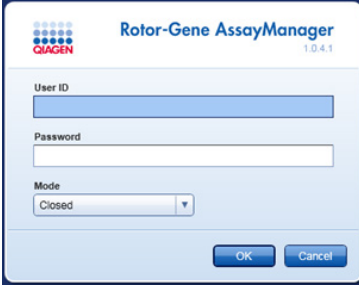
- Hem Epsilon Plug-in hem de QIASure Assay Profile'ın en güncel sürümünü QIAGEN web sitesinden indirin.
- Kurulum işlemine EpsilonPlugIn.Installation.msi dosyasına çift tıklayarak başlayın ve kurulum talimatlarını izleyin. Bu işlemin ayrıntılı açıklaması için *AssayManager Core Application Kullanım Kılavuzu* içinde "Installing Plug-ins" (Eklentilerin Kurulumu) bölümüne bakın.

Not: Sistem genelinde proses güvenliğini sağlamak adına, Settings (Ayarlar) sekmesini seçip kapalı mod için Material number required (Materyal numarası gerekli), Valid expiry date required (Geçerli son kullanma tarihi gerekli) ve Lot number required (Lot numarası gerekli) kutularını işaretleyin (Çalışma listesi bölümü). Bunlar etkinleştirilmemişse (işaretlenmemiş) ise tıklayarak etkinleştirin.

- Eklentinin başarıyla kurulmasından sonra, Rotor Gene AssayManager yazılımı için yönetici haklarına sahip bir kişinin AP_QIASure_V1_0_Y.iap tahlil profilini aşağıdaki gibi ie aktarması gerekir.

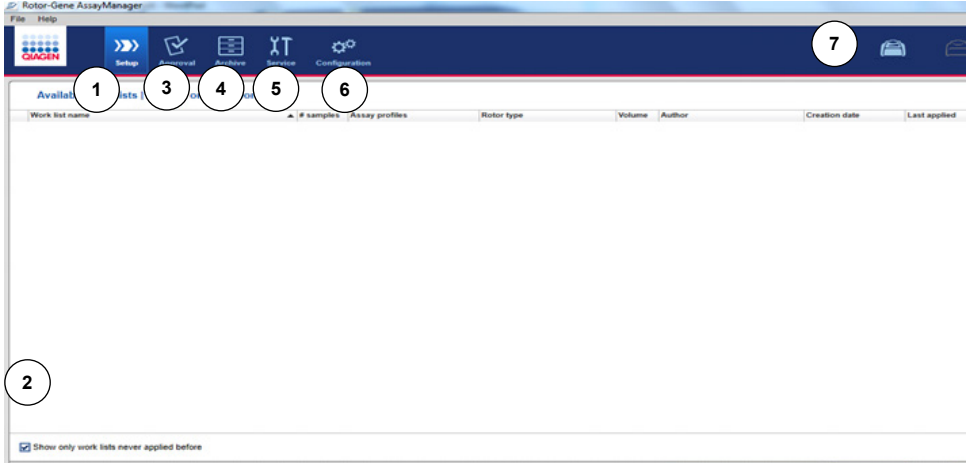


1. Simgeye tıklayarak Rotor-Gene AssayManager yazılımını açın. Rotor-Gene AssayManager penceresi açılır (bkz. Şekil 1).



Şekil 1. Rotor-Gene AssayManager oturum açma ekranı.

2. Kullanıcı kimliğiniz ve parolanızla Rotor-Gene AssayManager'da oturum açın. "Closed" (Kapalı) modu değiştirmeyin. OK (Tamam) öğesine tıklayın. Rotor-Gene Assay Manager ekranı açılır (Aşağıya bakın).



- 1 Set-up (Kurulum) sekmesi. Bu sekme, çalışma listelerinin yönetilmesini veya uygulanmasını sağlar.
- 2 Uygulanan çalışma listeleri işaretlendiğinde yalnızca yeni çalışma listeleri gösterilir.
- 3 Approval (Onay) sekmesi. Bu sekme önceki deneyleri (çalışmalar) bulmanızı sağlar.
- 4 Archive (Arşiv) sekmesi. Halihazırda onaylanmış olan eski deneyleri (çalışmalar) bulmanızı sağlar.

- 5 Service (Servis) sekmesi. Yazılım tarafından oluşturulan her dosyanın denetim izi raporunu gösterir
- 6 Configuration (Yapılandırma) sekmesi. Tüm yazılım parametrelerinin yapılandırılmasını sağlar
- 7 Rotor-Gene Q MDx simgeleri.



Bağlı değil



Bağlı

3. Yapılandırma ortamını seçin.
4. Assay Profiles (Tahlil Profilleri) sekmesini seçin.
5. Import (İçe Aktar) öğesine tıklayın.
6. İçe aktarmak üzere iletişim kutusundan, servikal numuneler için Tahlil Profili AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap dosyasını ve/veya Tahlil Profili AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap dosyasını seçin Open (Aç) öğesine tıklayın.

7. Tahlil profili başarıyla içe aktarıldıktan sonra "Setup" (Kurulum) ortamında kullanılabilir.

Not: Bir tahlil profilinin aynı sürümü iki kez içe aktarılamaz.

72 rotor ile Rotor-Gene Q MDx cihazlarında örnek işleme

Aynı çalışma (deney) içinde bir kalibratör ve şablonsuz kontrolün yanı sıra 70'e kadar bisülfite dönüştürülmüş DNA örneği test edilebilir. Tablo 1 içinde gösterilen şema, QIASure Methylation Test ile bir çalışma için örnek bir yükleme bloğu ve rotor kurulumu sunar. Sayılar, yükleme bloğu içindeki pozisyonları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

Tablo 1. Rotor-Gene Q MDx cihazında QIASure kitiyle bir çalışma için plaka ve rotor kurulumu

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

DİKKAT 	Tüpler Tablo 1 içinde gösterildiği şekilde rotor içine yerleştirilmelidir. Assay Profile'da (Tahlil Profili) ayarlanan otomatik analiz bu organizasyona dayalıdır. Farklı bir düzen kullanılması durumunda anormal sonuçlar alınır.
--	---

Not: Tüm kullanılmayan konumları boş tüplerle doldurun.

72 tüplü rotor ile Rotor-Gene Q MDx cihazlarında PCR

Günün ilk çalışmasından önce, Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM için 95 °C'de 10 dakikalık bir ısınma çalışması gerçekleştirin.

1. İşlenecek örnek için aşağıda belirtildiği gibi bir çalışma listesi oluşturun:

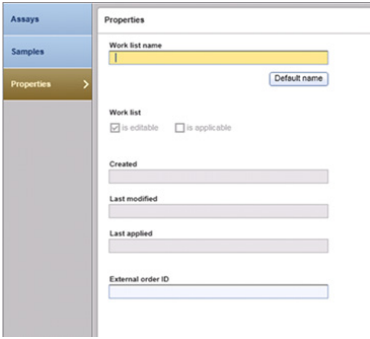
- 1a. Rotor-Gene Q MDx cihazını açın.
- 1b. Rotor-Gene AssayManager yazılımını açın ve kapalı modda operatör rolüne sahip bir kullanıcı olarak oturum açın.
- 1c. Çalışma listesi yöneticisinde New work list (Yeni çalışma listesi) ögesine tıklayın ("Setup" (Kurulum) ortamında).
- 1d. Kullanılabilir tahlil profilleri listesinden QIASure assay profile (QIASure tahlil profili) seçimi yapın.

Not: AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap Tahlil Profili servikal numunelere karşılık gelir; AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap Tahlil Profili ise hasta tarafından toplanan vajinal fırça örneklerine karşılık gelir.

Not: Deney başına yalnızca bir örnek tipi test edilebilir.

- 1e. Seçilen tahlil profilini Selected assay profiles (Seçilen tahlil profilleri) listesine aktarmak için Move (Taşı) ögesine tıklayın. Tahlil profili artık "Selected assay profiles" (Seçilen tahlil profilleri) listesinde görüntülenmelidir.
- 1f. İlgili alana, örnek sayısını girin.
- 1g. Kutunun kapağında bulunan aşağıdaki QIASure kit bilgilerini girin.
 - Materyal numarası: 1102417
 - YYYY-AA-GG formatını kullanarak geçerli son kullanma tarihi
 - Lot numarası

- 1h. Samples (Örnekler) adımını seçin. AssayManager ekranında, örnek ayrıntılarının bulunduğu bir liste gösterilir. Bu liste, beklenen rotor düzenini temsil eder.
- 1i. Örnek tanımlama numarasını/numaralarını her örnek için bir yorum gibi tüm isteğe bağlı örnek bilgileriyle birlikte bu listeye girin.
- 1j. Properties (Özellikler) adımını seçin ve bir çalışma listesi adı girin (Şekil 2).



Şekil 2. Özellikler

- 1k. Is applicable (Geçerlidir) onay kutusunu işaretleyin ve Apply (Uygula) ögesine tıklayın.
 - 1l. Çalışma listesini kaydedin.
Çalışma listesi yazdırılabilir; bu, PCR hazırlığına ve kurulumuna yardımcı olabilir. Çalışma listesini yazdırmak için Print work list (Çalışma listesini yazdır) ögesine tıklayın. Örnek ayrıntıları çalışma listenin bir parçası olarak dahil edilir.
- Not: Çalışma listesi, çalışma cihazda ayarlandığında oluşturulabilir veya örnekler cihaza eklenmeden önce kaydedilebilir.
2. QIAure çalışmasının kurulumunu yapın.
PCR reaksiyon kontaminasyonu riskini en aza indirmek için UV ışınlama özelliğine sahip bir PCR kabini kullanılmasını önemle tavsiye ederiz.
QIAure Master Mix'in dağıtımı, DNA bisülfid dönüşüm reaksiyonunun gerçekleştirildiği alandan farklı bir alanda gerçekleştirilmelidir.

DNA bozunmasına yol açan bir solüsyonla kullanmadan önce, şablon veya nükleaz kontaminasyonunu engellemek için tezgah alanını, pipetleri ve tüp askısını temizleyin.

Not: Yalancı pozitif sonuçlar alınmasına yol açabilecek spesifik olmayan şablon veya reaksiyon karışımı kontaminasyonunu önlemek için her bir tüp arasında uçları değiştirin.

2a. QIASure Master Mix'i ve QIASure Calibrator'ı tamamen çözündürün ve QIASure Master Mix'i mümkün olduğunca ışıktan koruyun.

Not: Materyal bozunmasını önlemek için çözündürme adımı 30 dakikayı aşmamalıdır.

2b. 10 defa baş aşağı çevirerek yavaşça karıştırın ve kullanımdan önce kısa süreliğine santrifüjleyin.

2c. Kullanımı hazır QIASure Master Mix'in 17,5 µL'sini uygun strip tüplere dağıtın. Reaksiyon kurulumu oda sıcaklığında yapılabilir.

2d. Materyal bozunmasını önlemek için QIASure Master Mix'i tekrar dondurucuya koyun.

2e. Tahlil kontrollerini ve bisüfit dönüştürülmüş örnekleri dağıtmak üzere tüpleri ayrı bir alana taşıyın.

2f. Şablonsuz kontrole (no template control, NTC) pozisyon 2 µL'ye 2,5 µL su ekleyin (bkz. yukarıdaki Tablo 1). Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.

2g. Pozisyon 1'e QIASure Calibrator'dan 2,5 µL ekleyin (bkz. yukarıdaki Tablo 1). Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın ve tüpü bir kapakla kapatın.

2h. İlgili tüpe 2,5 µL bisüfit dönüştürülmüş DNA ekleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.

2i. 4 tüplük bir set doldurulduktan sonra tüplerin kapaklarını kapatın.

Not: PCR tüpleri, örneklerin PCR tüplerine pipetlenmesi ile deneyin 2-8°C'de, karanlıkta başlatılması arasında 30 dakika saklanabilir.

2j. Materyal bozunmasını önlemek için QIASure Calibrator'ı tekrar dondurucuya koyun.

Not: Yalancı pozitif sonuçlar alınmasına yol açabilecek spesifik olmayan şablon veya reaksiyon karışımı kontaminasyonunu önlemek için her bir tüp arasında uçları değiştirin.

3. Rotor-Gene Q MDx'i hazırlayın ve çalışmayı (deneyi) aşağıdaki şekilde başlatın:

- 3a. Rotor tutucu üzerine 72 kuyulu bir rotor koyun.
- 3b. Rotoru Tablo 1'de gösterildiği şekilde atanmış pozisyonlara göre pozisyon 1'den başlayarak ve kullanılmayan tüm pozisyonlara boş kapaklı strip tüpleri yerleştirerek strip tüpleriyle doldurun.

Not: İlk tüpün pozisyon 1'e yerleştirildiğinden ve strip tüplerinin Tablo 1 içinde gösterildiği şekilde doğru yönelim ve pozisyonda yerleştirildiğinden emin olun.

- 3c. Kilitleme halkasını takın.
- 3d. Rotoru ve kilitleme halkasını Rotor-Gene Q MDx cihazına yükleyin; cihaz kapağını kapatın.
- 3e. Rotor-Gene AssayManager v1.0 yazılımında çalışma listesi yöneticisinden ilgili çalışma listesini seçin ve Apply (Uygula) öğesine tıklayın veya çalışma listesi hala açıksa sadece Apply (Uygula) öğesine tıklayın.

Not: Çalışma için çalışma listesi oluşturulmamışsa Rotor-Gene AssayManager v1.0 üzerinde oturum açın ve ilerlemeden önce adım 1'i izleyin.

- 3f. Çalışma (deney) adını girin.
- 3g. Kullanılacak döngüleyiciyi Cyclers selection (Döngüleyici seçimi) listesinden seçin.
- 3h. Kilitleme halkasının doğru takılıp takılmadığını kontrol edin ve ekranda bunu onaylayın.
- 3i. Start experiment (Deneyi başlat) öğesine tıklayın.
QIASure Methylation Test çalışması başlamalıdır.

4. Çalışma bittiğinde Finish run (Çalışmayı bitir) öğesine tıklayın.

5. Çıkarın ve çalışmayı onaylayın.

- Approver (Onaylayıcı) rolüyle oturum açan kullanıcılar Release and go to approval (Çıkar ve onaya git) öğesine tıklamalıdır.
- Operator (Operatör) rolüyle oturum açan kullanıcılar Release (Çıkar) öğesine tıklamalıdır.

6. Sonuçları çıkarın.

- Release and go to approval (Çıkar ve onaya git) ögesine tıklandıysa deney sonuçları görüntülenir.
- Kullanıcı rolündeki bir kullanıcı tarafından Release (Çıkar) ögesine tıklanmışsa "Approver" (Onaylayıcı) rolünde bir kullanıcı oturum açmalı ve "Approval" (Onay) ortamını seçmelidir.
- Filtre seçeneklerini belirleyip Apply (Uygula) ögesine tıklayarak onaylanacak tahlili filtreleyin.
- Sonuçları inceleyin ve her bir test örneğinin sonuçlarını onaylayın.

"Results" (Sonuçlar) tablosunda kaydırarak onaylanacak örneğe ilerleyin. Onaylanacak her örnek sonucunun kendi satır sonunda üç radyo düğmesi vardır.

Bir örneğin sonucunu kabul edin veya reddedin.

Not: Rotor-Gene AssayManager tarafından otomatik olarak INVALID (Geçersiz) olarak ayarlanmış bir sonuç, sonuç reddedilse bile artık geçerli bir sonuca dönüştürülemez.

İsteğe Bağlı: Sample comment (Örnek yorumu) sütununa bir yorum girin.

- Release/Report data (Verileri çıkar/raporla) ögesine tıklayın.
- OK (Tamam) ögesine tıklayın. Rapor Adobe Portable Document (.pdf) formatında oluşturulur ve önceden tanımlanmış klasörde otomatik olarak saklanır. Varsayılan klasör konumu: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Dışa Aktar > Raporlar)

Not: Bu konum ve klasör, "Configuration" (Yapılandırma) ortamından değiştirilebilir.

- Ham verilere karşılık gelen .rex dosyasını dışa aktarmak için Archive (Arşiv) sekmesine gidin. Filtre seçeneklerini kullanarak deneyinizi bulun ve show assays (tahlilleri göster) ögesine tıklayın. Ardından, Export .rex file (.rex dosyasını dışa aktar) ögesine tıklayın ve OK (Tamam) ögesine tıklayarak dosyayı kaydedin. Yazılım .rex dosyasını otomatik olarak aşağıdaki önceden tanımlanmış klasöre kaydeder: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments** (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Dışa Aktar > Deneyler)

Not: Bu konum ve klasör, Specify the .rex file export destination (.rex dosyası dışı aktarım hedefini belirtin) sekmesinde değiştirilebilir.

Not: Sorun giderme için çalışmanın destek paketi gereklidir. Destek paketleri Approval (Onay) veya Archive (Arşiv) ortamından oluşturulabilir.

<https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources> adresinden *Rotor-Gene AssayManager Core Application Kullanım Kılavuzu*, Troubleshooting (Sorun Giderme), "Creating a support package" (Destek paketi oluşturma) bölümüne bakın. Ek olarak, olay tarihinden itibaren ± 1 gün şeklinde denetim izine bakmak faydalı olabilir. Denetim izi, Service (Servis) ortamından alınabilir (bkz. *Rotor-Gene AssayManager Core Application Kullanım Kılavuzu*).

7. Rotor-Gene Q MDx cihazını boşaltın ve strip tüpleri yerel güvenlik düzenlemelerine uygun şekilde imha edin.

Sonuçların Yorumlanması

Analiz tamamen otomatiktir.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 öncelikle amplifikasyon eğrilerini analiz eder; şekillerine ve gürültü büyüklüklerine bakarak uygun olmayan eğrileri geçersiz sayabilir. Böyle bir durum söz konusu olursa, geçersiz sayılan eğri, bir bayrakla işaretlenir (bkz. Tablo 2).

Ardından Rotor-Gene AssayManager v1.0 çalıştırma kontrollerini analiz eder.

- Kalibratör
- NTC

Not: Çalışmanın sonunda oluşturulan rapor, çalışma kontrollerinden alınan sonuçları gösterir ve geçersiz verilerin önünde geçersizlik işaretleri bulunur.

Çalışmadaki tüm kontroller uygun değerdeyse Rotor-Gene AssayManager bilinmeyen örnekleri analiz eder.

Tablo 2, Rotor-Gene AssayManager v1.0 tarafından yapılan analiz esnasında her bir tüpe verilebilecek geçersiz kılıcı örnek işaretlerini ve bu işaretin anlamlarını içerir.

Tablo 2. Geçersiz kılıcı örnek işaretleri ve terimlerin açıklamaları

İşaret	Davranış	Açıklama
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Geçersiz)	Hedef değer tanımlanmış aralıktan yüksektir. Bu bir C_T , sonlanım noktası floresansı, konsantrasyon veya hesaplanmış değer, örn. ortalama C_T veya ΔC_T olabilir.
ASSAY_INVALID	Invalid (Geçersiz)	Tahlil geçersizdir çünkü en az bir harici kontrol geçersizdir.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Geçersiz)	Hedef değer tanımlanmış aralıktan düşüktür. Bu bir C_T , sonlanım noktası floresansı, konsantrasyon veya hesaplanmış değer, örn. ortalama C_T veya ΔC_T olabilir.
CONSECUTIVE_FAULT	Invalid (Geçersiz)	Bu hedefin hesaplanması için kullanılan bir hedef geçersizdir.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Invalid (Geçersiz)	Ham veri amplifikasyon eğrisi, bu tahlil için belirlenen davranıştan farklı bir şekil göstermektedir. Yanlış sonuç alınmış veya sonuçların yanlış yorumlanmış olması olasılığı yüksektir.
FLAT_BUMP	Invalid (Geçersiz)	Ham veri amplifikasyon eğrisi, bu tahlil için belirlenen davranıştan farklı olarak, düz çıkıntı gibi bir şekil göstermektedir. Yanlış sonuç alınmış veya sonuçların yanlış yorumlanmış olması olasılığı yüksektir (örn. yanlış C_T değeri tayini).
IN_ACCEPTED_RANGE	Geçerli	NTC, hedef ACTB için 36'nın üzerindeki sinyal C_T değerlerini gösterir.
INVALID_CALCULATION	Invalid (Geçersiz)	Bu hedef için hesaplama başarısızdır.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Invalid (Geçersiz)	Amplifikasyon eğrisi, eşiği bir defadan fazla geçmektedir. Belirsiz olmayan bir C_T saptanamamıştır.
NO_BASELINE	Invalid (Geçersiz)	Başlangıç referans çizgisi için hiçbir başlangıç değeri bulunmamıştır.
NO_CT_DETECTED	Variable (Değişken)	Bu hedef için C_T saptanamamıştır.
NO_VALUE	Invalid (Geçersiz)	Hedefin bir değeri yoktur ancak olması beklenmektedir. Bu değer belirli bir aralıkta olması gerekmez. Bu bir C_T , sonlanım noktası floresansı, konsantrasyon veya hesaplanmış değer, örn. ortalama C_T veya ΔC_T olabilir.
NORM_FACTOR_ALTERATION	Uyarı	Normalizasyon prosedürü sırasında sapma. Amplifikasyon eğrisi varsayılan normalizasyonla gösterilir; sonuçların doğruluk açısından manuel kontrolü gerekir.
OTHER_TARGET_INVALID	Invalid (Geçersiz)	Aynı örnek için başka bir hedef geçersizdir.

Tablo 2. Geçersiz kılıcı örnek işaretleri ve terimlerin açıklamaları

SATURATION	Invalid (Geçersiz)	Ham veri floresansı, amplifikasyon eğrisinin bükülme noktasından önce güçlü şekilde satüre olmaktadır.
SATURATION_IN_PLATEAU	Uyarı	Ham veri floresansı, amplifikasyon eğrisinin plato fazında satürasyon göstermektedir.
SPIKE	Uyarı	Amplifikasyon eğrisinin içinde ancak C _T 'nin belirlendiği alanın dışında ham veri floresansında ani bir artış saptanmıştır.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Invalid (Geçersiz)	Amplifikasyon eğrisinde C _T değerinin yakınında bir spayk saptanmıştır.
STEEP_BASELINE	Invalid (Geçersiz)	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresansı için dik bir şekilde yükselen referans çizgisi saptanmıştır.
STRONG_BASELINE_DIP	Invalid (Geçersiz)	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresansı için kuvvetli bir şekilde düşen referans çizgisi saptanmıştır.
STRONG_NOISE	Invalid (Geçersiz)	Amplifikasyon eğrisinin yükselme fazının dışında büyük bir gürültü saptanmıştır.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Invalid (Geçersiz)	Amplifikasyon eğrisinin yükselme (eksponansiyel) fazında güçlü parazit saptanmıştır.
UNCERTAIN	Variable (Değişken)	AUDAS sonuçları temel analiz sonuçlarıyla çatışmaktadır. Belirsiz olmayan otomatik veri geçerliliği değerlendirmesi mümkün değildir.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable (Değişken)	Amplifiye olmaması gereken bir hedef için bir C _T değeri saptanmıştır.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Geçersiz)	Hedefin bir değeri vardır ancak bu beklenen bir değer değildir. Bu bir C _T , sonlanım noktası floresansı, konsantrasyon veya hesaplanmış değer, örn. ortalama C _T veya ΔC _T olabilir.
UPSTREAM	Variable (Değişken)	Örnek durumu yukarı doğru bir proses (örn. QIAasympyphony) tarafından Invalid (Geçersiz) veya Unclear (Belirsiz) olarak ayarlanmıştır. Not: Unclear (Belirsiz) olarak işaretlenmiş örnekler için Rotor-Gene AssayManager davranışı AssayManager yazılımının "Configuration" (Yapılandırma) ortamında tanımlanmıştır. Yukarı doğru proseslerden "Invalid" (Geçersiz) işaretleri Rotor-Gene AssayManager içinde daima geçersiz bir karşılık gelen örnekle sonuçlanır.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Invalid (Geçersiz)	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresansı için dalgalı referans çizgisi saptanmıştır.

- Çalışmadaki tüm kontroller geçerliyse Rotor-Gene AssayManager v1.0 bilinmeyen örnekleri analiz eder. Sonuçların yorumlanabilmesi için bisülfite dönüştürülmüş DNA'nın minimal bir miktarı örnekte mevcut olmalıdır. Bu durum, kontrol geni ACTB'nin, Rotor-Gene AssayManager tarafından onaylanan bir örnek için $\leq 26,4$ olması gereken C_T değeriyle gösterilir.
- Ardından *FAM19A4* ve *hsa-mir124-2* için $\Delta\Delta C_T$ değerleri hesaplanır ve sonuç verilir. $\Delta\Delta C_T$ değeri eşik değerin altında olursa hedef, "Hipermetilasyon pozitif" olarak skorlanır.
Not: Kısmi veya düşük metilasyon seviyeleri doğal olarak görülen bir fenomen olup bunlar, hipermetilasyon seviyelerinden farklı olarak, kanser gelişimiyle doğrudan ilişkili değildir.
- Bir örnek, hedeflerden en az biri "Hypermethylation positive" (Hipermetilasyon pozitif) olarak skorlandığında "Hypermethylation positive" (Hipermetilasyon pozitif) olarak kabul edilir.
- Düşük DNA kalitesi/miktarına sahip örnekler ($ACTB$ C_T değerlerinin kabul kriterinin sınırında yer alması; C_T değerlerinin 25 - 26,4 aralığında olması) yanlış negatif olarak skorlanabilir. PCR'nin tekli olarak tekrar testi önerilir. Tekrar testi için negatif sonuç, örneğin hipermetilasyon negatif olduğu anlamına gelirken pozitif sonuç, örneğin hipermetilasyon pozitif olduğu anlamına gelir.
- Doğrudan dönüşüm protokolüyle işlenen yüksek hücresellliğe sahip örnekler, PCR reaksiyonunun DNA ile aşırı yüklenmesi riskine sahiptir ve bu da *FAM19A4* hedefi için yanlış negatif sonuca yol açabilir. Dolayısıyla 1) negatif bir hipermetilasyon sonucuna, 2) ≤ 23 şeklinde bir $ACTB$ C_T değerine ve 3) 10,36 ile 11,36 arasında bir *FAM19A4* $\Delta\Delta C_T$ değerine sahip örnekler için örneği suda seyrelterek PCR'nin 5 kat daha az dönüştürülmüş DNA girişi ile tekrarlanması tavsiye edilir.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu, ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına bakın: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servislerindeki bilim insanları her zaman bu el kitabındaki bilgiler ve protokoller ya da örnek ve tahlil teknolojileriyle ilgili tüm sorularınızı yanıtlamaktan mutluluk duyar (iletişim bilgileri için arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Rotor-Gene AssayManager ile ilgili sorun giderme bilgileri için *Rotor-Gene AssayManager Core Application Kullanım Kılavuzu* belgesine bakın.

Yorumlar ve öneriler

Genel Kullanım

Örnek DNA konsantrasyonu bisülfıt dönüşümü için çok düşük

DNA ekstraktını kontrol edin	DNA ekstraksiyonunu daha konsantre bir klinik örnekle tekrarlayın
------------------------------	---

Örnek geçersiz olarak skorlandı: ACTB amplifikasyonu çok düşük veya yok

a) Pipetleme hatası veya atlanmış reaktifler	Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
b) DNA konsantrasyonu kontrol edin	Bisülfıt dönüşümü için DNA girdisini en üst seviyeye çıkarın. Bisülfıt dönüşüm reaksiyonu, 100 ng–2 µg aralığında DNA girdisi için optimum performansa sahiptir
c) "Doğrudan servikal örnek üzerinde bisülfıt dönüşümü" protokolü için klinik örneği hücresellik açısından kontrol edin	Bisülfıt dönüşüm reaksiyonunu, PreservCyt toplama ortamındaki servikal numunenin %10'u (20 mL'nin 2 mL'si) ile tekrarlayın.
d) Bisülfıt dönüştürülmüş elüatı kontrol edin	Bisülfıt dönüşümünü tekrarlayın; gerekli olduğunda daha yüksek bir DNA girdisi kullanılabilir.

Örnek geçersiz olarak skorlandı: FAM19A4 ve/veya hsa-mir124-2 hedefleri geçersiz

Yetersiz karıştırma	Örnek ve reaksiyon karışımını pipetleyerek (tüp başına yaklaşık 10 defa) karıştırın. Örneği tekrarlayın.
---------------------	--

Pozitif kontrol geçersiz olarak skorlandı: hedeflerin biri veya daha fazlası için amplifikasyon çok düşük veya yok

a) Pipetleme hatası veya atlanmış reaktifler	Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
--	---

Yorumlar ve öneriler

b) Kısmi bozunma	Kit içeriklerini -30 ila -15 °C'de saklayın. Dondurma ve çözündürme döngülerini en fazla üç defa olacak şekilde sınırlayın.
c) PCR reaktiflerinde kısmi bozunma	Kit içeriklerini -30 ila -15 °C'de saklayın ve reaksiyon karışımlarını ışıktan koruyun. Tekrarlanan dondurma ve çözündürme işlemlerinden kaçının.
d) Strip tüpünün tersine çevrilmesi	Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin.
e) Son kullanma tarihi	Kullanılan kitin son kullanma tarihini kontrol edin.
f) Örneklerin pipetlenmesi ve çalışmanın başlatılması arasındaki gecikme süresi	PCR reaksiyonlarının karışımları örneklerin PCR reaksiyonlarına dağıtılması ve çalışmanın makinede başlatılması arasında, karanlıkta, 30 dakika boyunca 2-8 °C'de saklanabilir.

Şablonsuz kontrol (No template control, NTC) geçersiz

a) Pipetleme hatası	Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
b) Çapraz kontaminasyon	Tüm kritik reaktifleri değiştirin. Taşınma kontaminasyonunu önlemek için her zaman örnekleri, kit bileşenlerini ve sarf malzemelerini yaygın olarak kabul edilen uygulamalar çerçevesinde kullanın.
c) Reaktif kontaminasyonu	Tüm kritik reaktifleri değiştirin. Taşınma kontaminasyonunu önlemek için her zaman örnekleri, kit bileşenlerini ve sarf malzemelerini yaygın olarak kabul edilen uygulamalar çerçevesinde kullanın.
d) Strip tüpünün tersine çevrilmesi	Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin.
e) Örneklerin pipetlenmesi ve çalışmanın başlatılması arasındaki gecikme süresi	PCR reaksiyonlarının karışımları örneklerin PCR reaksiyonlarına dağıtılması ve çalışmanın makinede başlatılması arasında, karanlıkta, 30 dakika boyunca 2-8 °C'de saklanabilir.
f) Prob bozunması	Reaksiyon karışımlarını ışıktan koruyun. Floresan eğrisinde yanlış pozitif kontrolü yapın.

Örnekte sinyal yok veya düşük ama kontrol çalışması iyi

a) İnhibe edici etkiler	Santrifüjleme işleminden sonra, bisülfid dönüşümü sırasında filtre üzerinde tampon kalmadığını mutlaka kontrol edin. Bisülfid dönüşümünü tekrarlayın.
b) Pipetleme hatası	Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

Eğer sorun devam ederse, QIAGEN Teknik Servisi ile kontak kurun.

Sınırlamalar

QIASure Methylation Test reaktifleri yalnızca in vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

PCR testlerinin kullanımı ekipmanların bakımı dahil olmak üzere, moleküler biyolojiye özel ve yürürlükteki yönetmeliklere ve ilgili standartlara uygun iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

Bu kitte sağlanan reaktifler ve talimatlar optimum performans için doğrulanmıştır.

QIASure Methylation Test, Rotor-Gene Q MDx cihazlarının ve Rotor-Gene AssayManager v1.0 yazılımının kullanımında eğitimli laboratuvar uzmanları tarafından kullanılmalıdır.

Ürün sadece real-time PCR teknikleri ve in vitro diagnostik işlemler konusunda özel talimat almış ve eğitimli personel tarafından kullanılmalıdır. Elde edilmiş herhangi bir tanı amaçlı sonucun diğer klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte yorumlanması gerekir.

Optimum PCR sonuçları için kullanım kılavuzuna (el kitabı) katı olarak uymak gerekir.

Tüm bileşenlerin etiketleri ve kutusunda basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Düşük DNA kalitesi/miktarına sahip örnekler (ACTB C_T değerlerinin kabul kriterinin sınırında yer alması; C_T değerlerinin 25 - 26,4 aralığında olması) yanlış negatif olarak skorlanabilir. Tekli olarak tekrar testi önerilir. Tekrar testi için negatif sonuç, örneğin hipermetilasyon negatif olduğu anlamına gelirken pozitif sonuç, örneğin hipermetilasyon pozitif olduğu anlamına gelir.

QIASure Methylation Test ile birlikte verilen tüm reaktifler, yalnızca aynı kit ile birlikte verilen reaktiflerle birlikte kullanıma yöneliktir. Aksi takdirde performans etkilenebilir.

QIASure Methylation Test, HPV pozitif kadınlar için onaylanmıştır.

QIASure Methylation Test, PreservCyt, SurePath™ veya STM ortamında toplanan ve saklanan servikal numuneler ve laboratuvara geldikten sonra PreservCyt içinde saklanmış kendi kendine toplanan vajinal fırça numuneleri için onaylanmıştır.

QIASure Methylation Test PCR tahliliyle birlikte kullanım için yalnızca Rotor-Gene Q MDx onaylanmıştır.

Bu ürünün herhangi bir etiket dışı kullanımı ve/veya bileşenlerin değiştirilmesi Self-screen B.V. sorumluluğunu geçersiz kılar.

Self-screen performans çalışmaları kapsamında olmayan laboratuvarlarında kullanılan herhangi bir prosedür için sistem performansının doğrulanması kullanıcıların sorumluluğundadır.

Performans Özellikleri

Tespit Sınırı (Limit Of Detection, LOD)

QIASure Methylation Test'in analitik duyarlılığı, plazmidin her üç ampikon sekansını da (*ACTB*, *FAM19A4* ve *hsa-mir124-2*; PCR başına 750.000 ila 0,25 kopya aralığı) içeren bir seri dilüsyon serisi kullanılarak, %95 tespit sınırı (%95 LOD) olarak belirlenmiştir. Hedefler için %95 LOD, 36 pozitif sonuçtan en az 35'ini veren en düşük plazmid dilüsyonu olarak değerlendirilmiştir ($C_T < 40$). Toplamda, dört farklı operatör tarafından (günde operatör başına 1 çalışma) üç farklı Lot ve üç farklı RGQ sistemi kullanılarak 12 deney gerçekleştirilmiştir. Her bir deneyde, 11 plazmid dilüsyonunun üçlü testi yer almıştır. Üç farklı hedefin tümü için %95 LOD, PCR başına 7,5 kopya olmuştur.

Doğrusallık

QIASure tahlilinin doğrusallığı, %95 LOD'yi değerlendirmek için gerçekleştirilen 12 deneyin verileriyle belirlenmiştir. İki hedef (*FAM19A4* ve *hsa-mir124-2*) ve referans *ACTB*, 750.000'den PCR başına 7,5 kopyaya kadar doğrusal amplifikasyona sahip olmuştur.

Hassasiyet

QIASure Methylation Test'in hassasiyeti, tahlil içi değişkenlik (bir deney içinde aynı konsantrasyona sahip örneklerin çoklu sonuçlarının değişkenliği) ve tahlilin toplam varyansı (tahlilin farklı operatörler tarafından, farklı cihazlarda, farklı lotlarla, farklı laboratuvarlarda alınan çoklu sonuçlarının değişkenliği) olarak belirlenmiştir. Test, hem *FAM19A4* hem de *hsa-mir124-2* için LOD konsantrasyonunun yaklaşık 3 katına karşılık gelen sinyallerle hipermetilasyon pozitif sonucu veren yüksek riskli HPV pozitif bir servikal numuneden elde edilen bisülfid dönüştürülmüş DNA üzerinde gerçekleştirilmiştir. Test, iki farklı laboratuvarda iki farklı Lot ve üç farklı RGQ makinesi kullanan dört farklı operatör tarafından (günde operatör başına bir çalışma), iki tekrarlı olarak, 8 çalışma halinde gerçekleştirilmiş ve örnek başına 16 veri noktası elde edilmiştir. C_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri için varyasyon katsayısı (coefficient of variation, CV) belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Metilasyon pozitif bir servikal örnekte CT ve $\Delta\Delta CT$ değerlerinin %CV'si

	Örnek tipi	Örnek tipi (%)	Örnek tipi (%)
CT değeri	Dahili örnek kalite kontrolü (ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
$\Delta\Delta CT$ değeri	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Bahsi geçen konsantrasyondaki bir örneğin C_T değerlerinin genel istatistiksel yayılımı, dahili örnek kalite kontrolü (ACTB) için %1,32, *FAM19A4* için %1,52 ve *hsa-mir124-2* için %1,64 olmuştur. Bahsi geçen konsantrasyondaki bir örneğin $\Delta\Delta C_T$ değerlerinin genel istatistiksel yayılımı, *FAM19A4* için %5,97 ve *hsa-mir124-2* için %5,75 olmuştur.

Olumsuz etkileyen maddeler

PCR üzerindeki potansiyel etkileri için seçilen inhibe edici maddeler, bisülfite dönüşüm kitinin desülfonasyon ve yıkama tamponu olmuştur. Orijinal örnekte potansiyel olarak bulunan maddeler, örnek DNA'sının iki defa silika boncuklarla saflaştırılmış olduğu, dolayısıyla bisülfite dönüşümünden sonra orijinal örnek ve DNA'nın temizlenerek DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildiği dikkate alınarak test edilmemiştir. Desülfonasyon ve yıkama tamponunun izleri, dahili örnek kalite kontrolü için geçersiz bir test sonucuyla saptandığı gibi, PCR'de olumsuz etki göstermiştir.

Klinik Performans

HPV pozitif servikal numuneler*

Servikal intraepitelyal neoplazi sınıf 3 (CIN 3) ve servikal kanser (yani CIN 3+) için QIASure Methylation Test'in klinik performansı, AB çok merkezli, retrospektif bir çalışmada değerlendirilmiştir (13). QIASure Methylation Test, AB ülkelerindeki (İskoçya, Slovenya, Danimarka, Hollanda) kadınlardan (29-76 yaş arası) elde edilen 2384 HPV pozitif servikal tarama örneğinde değerlendirilmiştir (13). Numuneler, PreservCyt veya SurePath ortamlarında toplanmıştır. Çalışma popülasyonu, CIN 2 ile 124, CIN 3 ile 228 ve kanser ile 20 olmak üzere 2 yıllık takip süresi içinde ($\leq$ CIN 1 olarak kısaltılmıştır) hastalık kanıtı olmayan 2012 kadından oluşmaktadır. DNA, servikal örneklerden ekstrakte edilmiştir ve bisülfid dönüşüm reaksiyonunda (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research) girdi olarak 250 ng DNA kullanılmıştır. PCR'de, 250 ng modifiye DNA'nın %20'si kullanılmıştır (50 ng orijinal hedef DNA/PCR'ye karşılık gelir). QIASure Methylation Test pozitiflik oranlarının klinik sonuçları noktasına göre sınıflandırılmış genel pozitiflik oranları aşağıda verilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. QIASure Methylation Test pozitiflik oranları

Klinik sonuç noktası	Kesir	Pozitiflik oranı (%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)
Servikal kanser	19/20	%95,0 (70,7-99,3)

Yüksek riskli HPV pozitif servikal örnekler arasında, CIN 3+ için duyarlılık %78,6 (195/248; %95 CI: 73,1-88,3) ve QIASure Methylation Test için genel özgüllük %78,3 (n = 2013; %95 CI: 76-80) olarak tespit edilmiştir. hrHPV pozitif, metilasyon negatif sonuçların negatif öngörücü değeri, servikal kanser için %99,9 (N = 1694; %95 CI: 99,6-99,99), CIN3+ için %96,9 (%95 CI: 96-98) ve CIN2+ için %93,0 (%95 CI: 92-94) olarak tespit edilmiştir.

* Doktor tarafından toplanan servikal numuneler.

Ek olarak, servikal kanser duyarlılığı, 25'ten fazla ülkeden farklı histotiplere sahip 519 invazif kanser üzerinde dünya çapında çok merkezli retrospektif bir çalışmada değerlendirilmiştir (11). DNA, servikal örneklerden ekstrakte edilmiştir ve bisülfid dönüşüm reaksiyonunda (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research) girdi olarak 250 ng DNA kullanılmıştır. PCR'de, 250 ng modifiye DNA'nın %20'si kullanılmıştır (50 ng orijinal hedef DNA/PCR'ye karşılık gelir). 519 kanserden 510'u QIASure Methylation test ile pozitif sonuç vermiştir ve %98,3 pozitiflik oranı elde edilmiştir (%95 CI: 96,7-99,2), histotip başına sınıflandırılan pozitiflik oranları aşağıda Tablo 5. Servikal kanser numunelerinde QIASure methylation test pozitiflik oranı içinde verilmiştir.

Tablo 5. Servikal kanser numunelerinde QIASure methylation test pozitiflik oranı

Klinik sonlanım noktası	Kesir	Pozitiflik oranı (%95 CI)
Skuamöz hücreli karsinom	313/318	%98,4 (96,4-99,5)
Adenokarsinom	121/123	%98,4 (94,2-99,8)
Adenoskuamöz hücre karsinomu	42/42	%100,0 (91,6-100)
Nadir kanser histotipleri	30/32	%93,8 (79,2-99,2)
Kanser Histotipi belirtilmemiştir	4/4	%100 (39,8-100,0)

Kendi kendine toplanan HPV pozitif vajinal fırça numuneleri

QIASure Methylation Test'in hasta tarafından toplanan vajinal fırça numunelerinde, 3. derece servikal intraepitelyal neoplazi (cervical intraepithelial neoplasia, CIN 3) ve servikal kanseri (CIN 3+) saptama yönündeki klinik performansı, 247 adet yüksek riskli HPV pozitif vajinal numune test edilerek değerlendirilmiştir. 14 örnek (%5,7) için ACTB C_T değerleri >26,4 olarak tespit edilmiş ve ardından geçersiz olarak skorlanmıştır. Geçerli test sonuçlarına sahip örnekler, 18 ay takip sonrasında ≤CIN 1 aşamasındaki kadınlara ait 148 adet hasta tarafından toplanan fırça örneğinden, CIN 2 aşamasındaki 24 örnekten, CIN 3 aşamasındaki 50 örnekten, skuamöz hücreli karsinom bulunan 8 örnekten ve adenokarsinom bulunan 3 örnekten oluşmuştur. DNA, vajinal numunelerden ekstrakte edilmiştir ve bisülfid dönüşüm reaksiyonunda (EZ DNA methylation kit, ZYMO Research) girdi olarak 250 ng DNA kullanılmıştır. PCR'de, 250 ng bisülfid dönüştürülmüş DNA'nın %20'si kullanılmıştır (50 ng orijinal hedef DNA/PCR'ye karşılık gelir). QIASure Methylation Test'in klinik sonlanım noktası ile sınıflara ayrılan pozitiflik oranları aşağıda verilmektedir (Tablo 6).

Tablo 6. Kendi kendine toplanan vajinal fırça numunelerinde QIASure Methylation Test pozitiflik oranları

Klinik sonlanım noktası	Kesir	Pozitiflik oranı (%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)
Skuamöz hücreli karsinom	8/8	%100 (63,1-100,0)
Adenokarsinom	3/3	%100 (29,2-100,0)

Yüksek riskli HPV pozitif, hasta tarafından toplanan vajinal fırça numuneleri arasında, CIN 3+ için duyarlılık %72,1 (44/61; %95 CI: 59,7–81,9) ve karsinom için duyarlılık %100 (11/11, %95 CI: 72–100) olmuştur. *

FAM19A4 ve hsa-mir124-2 hedeflerinin dönüşen ileri CIN lezyonlarını saptama performansı

Konak hücre promotör metilasyon analizi, spesifik olarak, kanser benzeri bir metilasyon profili barındıran ve kısa vadede kansere ilerleme riskinin yüksek olması beklenen, "ileri" CIN lezyonları adlı lezyonları tespit eder (7, 8). *FAM19A4* ve *hsa-mir124-2* hedeflerinin promotör hipermetilasyon analizinin performansı, dönüşmekte olan ileri CIN 2/3 aşamasındaki kadınlardan alınan 29 adet yüksek riskli HPV pozitif numune ve dönüşmekte olan erken dönem CIN 2/3 aşamasındaki kadınlardan alınan 19 adet yüksek riskli HPV pozitif numune test edilerek değerlendirilmiştir. Metilasyon, tüm ileri CIN2/3 lezyonlarını (%100; 29/29; %95 CI: 88–100) hipermetilasyon pozitif olarak skorlayarak, özellikle ilerlemiş hastalıkla ilişkilendirilmiştir (erken dönem CIN 2/3 lezyonlarının %47 (9/19; %95 CI: 27–69) oranı ile karşılaştırıldığında).

* Not: İleri CIN lezyonu ve/veya servikal kanser görülen kadınların örneklerindeki hedeflerin hipermetilasyonu, örnek alımındaki değişkenlik (örneğin yetersiz örnek alımı sonucu) nedeniyle saptanamayabilir.

Güçlülük

QIASure Methylation Test'in güçlülüğü, QIASure Methylation Test'in çıktısı ve tahlilin Yalnızca Araştırma Kullanımına (Research Use Only, RUO) yönelik versiyonunun çıktısı arasındaki uyum olarak belirlenmiştir. Test, 5'i her iki belirteç için önceden hipermetilasyon negatif olarak tanımlanan, 5'i ise metilasyon pozitif olarak tanımlanan (örn. 2 belirteçten en az biri için) 10 adet yüksek riskli HPV pozitif servikal örnekten elde edilen bisülfid dönüştürülmüş genomik DNA üzerinde gerçekleştirilmiştir. Test, iki farklı laboratuvarda iki farklı Lot ve üç farklı Rotor-Gene Q MDx cihazı kullanan dört farklı operatör tarafından (günde operatör başına bir çalışma), iki tekrarlı olarak, 8 çalışma halinde gerçekleştirilmiştir. Toplamda her bir örnek için 16 veri noktası elde edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. QIASure Methylation Test ile tahlilin RUO versiyonunun uyumu

Örnek numarası	RUO sonucu	RUO'ya kıyasla Laboratuvar 1 Uyumu	RUO'ya kıyasla Laboratuvar 2 Uyumu
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)
Alt toplam		%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)
Alt toplam		%100 (40/40)	%100 (40/40)

Önceden metilasyon negatif olarak tanımlanan beş örnekten dördü, her iki laboratuvarında QIASure Methylation Test kullanıldığında %100 uyum sergilemiştir. Örnek 3, her iki laboratuvarında %62,5 (5/8) uyum sergilemiştir. Gözlemlenen varyasyon, tahlil eşik değeri civarında seviyelere sahip *FAM19A4* ile ilişkili olmuştur. Metilasyon negatif örnekler arasındaki genel uyum %92,5 (37/40) olmuştur.

Önceden metilasyon pozitif olarak tanımlanan 5 örneğin tümü, referans tahlil ile %100 uyum sergilemiş ve böylece genel uyum %100 (40/40) olmuştur.

Doğrudan servikal numuneler üzerinde bisülfıt dönüşümü

"EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit kullanarak doğrudan servikal numuneler üzerinde bisülfıt dönüşümü" protokolü, referans protokole göre (öncesinde örnek DNA'sının miktar kontrolü yapılan bisülfıt dönüşümü) 119 servikal kazıntı üzerinde doğrulanmış ve ardından QIASure Methylation Test gerçekleştirilmiştir. %2,5 servikal numune girdisi kullanılarak, doğrudan servikal örnekler üzerinde yapılan bisülfıt dönüşümünün başarı oranı %95,8 (114/119) olmuş ve geçersiz sonuçlar %10 servikal numune girdisiyle yeniden test edilerek %100'e çıkarılmıştır. QIASure Methylation Test sonucunun bisülfıt dönüşüm protokolleri arasındaki uyumu, %90,8 (108/119; kappa değeri 0,75) olmuştur.

"QIASymphony Bisulfite Kit kullanarak doğrudan servikal numuneler üzerinde bisülfıt dönüşümü" protokolü, referans protokole göre (öncesinde örnek DNA'sının miktar kontrolü yapılan bisülfıt dönüşümü) 120 servikal kazıntı üzerinde doğrulanmış ve ardından QIASure Methylation Test gerçekleştirilmiştir. %2,5 servikal numune girdisi kullanılarak, doğrudan servikal örnekler üzerinde yapılan bisülfıt dönüşümünün başarı oranı referans protokolü ile %97,5'e (117/120) kıyasla %94,2 (113/120) olmuştur. QIASure Methylation Test sonucunun bisülfıt dönüşüm protokolleri arasındaki uyumu, %94,7 (107/113; kappa değeri 0,88) olmuştur.

Referanslar

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

Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:

Sembol	Sembol tanımı
	Son kullanma tarihi
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	CE-IVD işaretli sembol
	<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir
	Katalog numarası
	Lot numarası
	Materyal numarası
	Bileşenler
	İçerik
	Numara
Rn	R Kullanma Talimatı (El Kitabı) revizyonudur ve n revizyon numarasıdır
	Küresel Ticaret Parça Numarası
	Sıcaklık sınırlaması
	Üretici
	Işığa maruz bırakmayın



Kullanım talimatlarına başvurun



Dikkat

İletişim Bilgileri

Teknik destek ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezimize başvurun, 00800-22-44-6000 numarasını arayın ya da QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden birine veya yerel distribütörlere başvurun (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Sipariş Bilgileri

Ürün	İçerik	Kat. no.
QIASure Methylation Test Kit	72 reaksiyon için: 2 Master Mix, 2 Calibrator.	616014
QIAAsymphony SP	QIAAsymphony örnek hazırlama modülü; parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir (otomatik ekstraksiyon için isteğe bağlı)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) artı HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahildir	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanal artı HRM kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx Aksesuarları		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	72 x 0,1 mL tüplerde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon ayarı için alüminyum blok	9018901

Ürün	İçerik	Kat. no.
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	1000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 250 strip	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1mL (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 10 x 250 strip	981106
Rotor-Gene AssayManager — Rotor-Gene Q MDX cihazları ile rutin test yapmak için		
Rotor-Gene AssayManager	Rotor-Gene Q ve QIA Symphony RGQ aletleriyle kombinasyon halinde rutin test yapılması için yazılım; bir bilgisayarda kurulum için tek lisanslı yazılım	9022739

Güncel lisanslama bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Bu sayfa özellikle boş bırakılmıştır.

Belge Revizyon Geçmişi

Tarih

Değişiklikler

R4, Haziran 2019

Prensip ve Prosedür kısmındaki iş akışı prosedürü akış şeması revize edildi; Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller kısmına EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit eklendi; Güvenlik Bilgileri kutu içeriği revize edildi; RGQ MDx 5-plez HRM için ısınma çalışması hakkında bilgiler eklendi; Örnek Hazırlama kısmı revize edildi; İlave sorun giderme öğesi eklendi; Performans Özellikleri kısmına Doğrudan servikal numuneler üzerinde bisülfite dönüşümü konusu eklendi; Referanslar kısmı güncellendi; Düzen güncellemeleri

R5, Temmuz 2023

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller kısmına isteğe bağlı ekstraksiyon otomasyonu ve QIASymphony Bisulfite kit için QIASymphony cihazı eklendi; Örnek hazırlama bölümü revize edildi; SurePath toplama ortamının kullanımı eklendi; Klinik performans bölümü revize edildi. Tablo 5 ve tablo 6 başlıkları eklendi.

QIASure Methylation Test için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

- Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, ürünle sağlanan protokoller, bu el kitabı ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kitin içindeki bileşenlerin kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde test edilmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
- Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
- Bu kit ve bileşenleri tek kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
- QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
- Kitin satın alıcısı ve kullanıcıyı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkeme bu Sınırlı Lisans Sözleşmesi yasaklarını uygulayabilir ve bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin ya da kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. www.qiagen.com.

Self-screen B.V., QIASure Methylation Test'in yasal üreticisidir.

QIASure Methylation Test, Self-screen B.V. tarafından üretilmiştir ve Avrupa'da QIAGEN tarafından dağıtılmaktadır.

Ticari Markalar: 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.). Bu belgede geçen tescilli adlar, ticari markalar vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarca korunmaktadır.

07-2023 HB-2304-005 1132288 © 2023 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

Sipariş www.qiagen.com/shop | Teknik Destek support.qiagen.com | Web Sitesi www.qiagen.com