

Juli 2023

QIAzure™ Methylation Test

Brugsanvisning (Håndbog)



Version 1

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



616014

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

1132288DA

Indhold

Tilsigtet anvendelse	4
Oversigt og forklaring	5
Funktionsprincip	5
Leverede materialer.....	7
Kit-indhold	7
Påkrævede materialer, der ikke medfølger.....	7
Advarsler og forholdsregler.....	10
Sikkerhedsinformation	10
Generelle forholdsregler.....	10
Forholdsregler med hensyn til AssayManager-profiler	12
Opbevaring og håndtering af reagenser	13
Prøvehåndtering og -opbevaring.....	14
Klargøring af prøver, som opbevares i PreservCyt	15
Klargøring af prøver, som opbevares i SurePath™	18
Generelle anbefalinger vedrørende bisulfitkonvertering	19
Protokol: QIASure Methylation Test PCR i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	20
Fortolkning af resultater	31
Fejlfindingsvejledning	35
Begrænsninger	37
Ydelseskarakteristik	39
Påvisningsgrænse (LOD, Limit of Detection)	39
Linearitet	39

Præcision	39
Interfererende stoffer	40
Klinisk ydeevne	41
Robusthed	43
Litteraturhenvisninger.....	46
Symboler	48
Kontaktoplysninger	49
Bestillingsinformation.....	50
Revisionshistorik for dokumentet	53

Tilsigtet anvendelse

QIASure Methylation Test (kat.-nr. 616014) er en methyleringsspecifik multiplex-real-time PCR-analyse til påvisning af promoter-hypermethylering af generne *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*. Prøver, der kan testes med QIASure Methylation Test, omfatter bisulfitkonverteret DNA, der er isoleret fra prøver indsamlet på følgende måder:

- Cervikale prøver indsamlet med *digene*® HC2 DNA Collection Device (af en læge)
- Cervikale prøver indsamlet ved hjælp af en børste-/kostlignende prøvetagningsenhed og placeret i PreservCyt® Solution eller SurePath™ Solution (af en læge)
- Vaginale prøver, der er indsamlet ved hjælp af en børste-/kostlignende testningsenhed (af patienten)

Brugsindikationer:

1. Som opfølgningstest til kvinder, der er testet positiv for human papillomavirus (HPV), for at afgøre behovet for henvisning til kolposkopi eller andre opfølgningsprocedurer.
2. Som opfølgningstest til kvinder, der er testet positiv i en Pap-test med atypiske pladeepitler af ubestemt signifikans (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US) for at vurdere behovet henvisning til en kolposkopi eller andre opfølgningsundersøgelser.

Dette produkt er beregnet til at blive brugt af fagfolk, f.eks. teknikere og bioanalytikere med kvalifikationer inden for in vitro-diagnostiske procedurer og molekylærbiologiske teknikker samt brug af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-systemet.

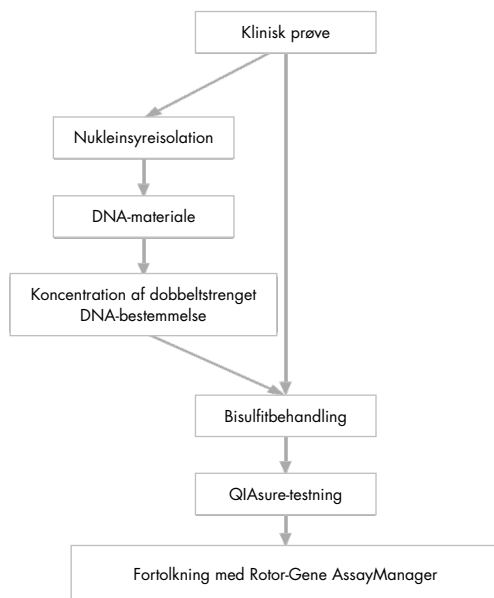
Oversigt og forklaring

DNA-methylering er en biokemisk proces, der er vigtig for den normale udvikling hos højerestående organismer (1). Den omfatter tilføjelsen af en methylgruppe til 5. position i pyrimidinringen i cytosinnucleotidet. Unormale DNA-methyleringsmønstre spiller også en stor rolle i carcinogenese. I mange former for human cancer og cancercellelinjer, herunder cervikal cancer og endometrial cancer, er der påvist promoter-hypermethylering af generne *FAM19A4* (familie med sekvenslighed 19 (kemokinlignende (C-C-motivlignende) sekvenslighed) for medlem A4) og/eller *hsa-mir124-2* (*homo sapiens micro RNA 124-2*) (2-6). Ved en analyse af værtscelle-promoter-methylering påvises specifikt cancertyper og såkaldt "fremskredne" CIN-læsioner (cervikal intraepitelial neoplas) med en cancerlignende methyleringsprofil og stor risiko for på kort sigt at føre til cancer (3, 7, 8, 10, 11, 12 og 14). QIASure-analysen gør det muligt at påvise promoter-hypermethylering af generne *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* på bisulfitkonverteret DNA, der er isoleret fra cervikale eller vaginale prøver ved hjælp af ACTB (humant β -actin-gen) som intern prøve kvalitetskontrol.

Funktionsprincip

QIASure Methylation Test er en multiplex-real-time PCR-test, der forstærker de methylerede promoter-områder af tumorsuppressorgenerne *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* samt et methylerings-uspecifikt fragment af et referencegen. Kittet består af 2 rør QIASure Master Mix og 2 rør QIASure Calibrator. Masterblandingen er beregnet til at forstærke det bisulfitkonverterede DNA, som er klargjort fra kliniske prøver. Masterblandingen indeholder primere og prober til målgenerne og referencegenet, der fungerer som kvalitetskontrol af den interne prøve. Kalibratoren er et lineariseret plasmid, der indeholder sekvenser af *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* og ACTB-amplikoner.

Arbejdsgangprocedure



QIASure-analysen køres på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og der udføres automatisk dataanalyse og -fortolkning via Rotor-Gene AssayManager®-softwaren. C_T -værdien (cyklustærsklen) svarer til det antal PCR-cykler, der er nødvendigt til detektion af et fluorescerende signal over et baggrundssignal, hvilket svarer til antallet af målmolekyler i prøven. I QIASure-analysen beregnes ΔC_T -værdien som forskellen mellem C_T -værdien for målet *FAM19A4* eller *hsa-mir124-2* og C_T -værdien for referencen (ACTB). Denne ΔC_T -værdi er en relativ kvantitativ værdi for promotor-metyleringsniveauet af *FAM19A4*- eller *hsa-mir124-2*-genet. Ved normalisering trækkes ΔC_T -værdien for en kalibratorprøve fra ΔC_T -værdien for målet *FAM19A4* eller *hsa-mir124-2*, hvilket resulterer i en $\Delta\Delta C_T$ -værdi (9). Kalibratoren er en standardiseret fåtallig plasmid-DNA-prøve med et kendt antal kopier for de tre mål (dvs. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* og ACTB).

Leverede materialer

Kit-indhold

QIASure Methylation Test		72
Katalognr.		616014
Antal reaktioner		72
QIASure Master Mix (2 rør)	Brunt rør	630 µl
QIASure Calibrator (2 rør)	Gennemsigtigt rør	25 µl
Brugsanvisning til QIASure Methylation Test (håndbog)		1

Påkrævede materialer, der ikke medfølger

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Forbrugsvarer og reagenser til klargøring af selvtagne prøver

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

Reagenser til klargøring af prøver, som opbevares i SurePath-indsamlingsmedie

- Buffer AL (QIAGEN-katalognummer: 19075)

Forbrugsvarer og reagenser til bisulfitkonvertering

Bekræftede kits til bisulfitkonvertering indeholder:

- 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)

Forbrugsvarer til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet

- Strip tubes and Caps, 0.1 mL (kat.-nr. 981103)
- Oprenset vand (f.eks. molekylærbiologisk kvalitet, destilleret eller afioniseret)

Udstyr

- Justerbare pipetter*, der er beregnet til PCR (1-10 µl; 10-100 µl)
- Engangshandsker
- Bordcentrifuge* med en hastighed > 10.000 rpm
- Vortex-mixer*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, kat.-nr. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, kat.-nr. ND-3300) eller tilsvarende
- QIAsymphony SP-system (kat.-nr. 9001297) til valgfri automatiseret ekstraktion og/eller bisulfitkonvertering

* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

Udstyr til real-time PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-system (kat.-nr. 9002033) eller Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument (kat.-nr. 9002032)*
- Rotor-Gene AssayManager Core Application, softwareversion 1.0.x (hvor x er større end eller lig med 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in installeret, version 1.0.x (hvor x er større end eller lig med 1)
- QIASure Assay Profile (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (hvor Y er større end eller lig 1) til anvendelse af bisulfitkonverteret DNA fra lægeindsamlede cervikale prøver
- QIASure Assay Profile til selvtaget børsteprøve (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (hvor Y er større end eller lig 0) til anvendelse af bisulfitkonverteret DNA fra selvtagne vaginale børsteprøver

* Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med fremstillingsdato i januar 2010 eller senere. Produktionsdatoen findes under serienummeret på bagsiden af instrumentet. Serienummeret findes i formatet "mmåånnn", hvor "mm" står for produktionsmåned i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den entydige instrumentidentifikator.

Advarsler og forholdsregler

Kun til in vitro-diagnostisk brug.

Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Se de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere oplysninger. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN®-kit og tilhørende komponenter.

QIASURE MASTER MIX



Indeholder: 1,2,4-triazol: Fare! Mistanke om forringet fertilitet eller skade på det ufødte barn. Bær beskytteshandsker/ beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

Generelle forholdsregler

Brug af PCR-test kræver god laboratoriepraksis, herunder vedligeholdelse af udstyr, der er dedikeret til molekylærbiologi, og som overholder gældende lovgivning og relevante standarder.

Vær altid opmærksom på følgende:

- Brug beskyttende pudderfri engangshandsker og øjenværn ved håndtering af prøver.
- Forebyg kontaminering af prøven og kittet med mikrober og nuklease (DNase). DNase kan resultere i degradering af DNA-skabelonen.

- Undgå kontaminering ved overførsel af DNA eller PCR-produkt, hvilket kan resultere i et falskt positivt signal.
- Benyt altid DNase-fri engangspipettespidser med aerosolbarrierer.
- Reagenser i QIASure-analysen er optimalt fortyndede. Fortynd ikke reagenserne yderligere, da dette kan resultere i forringet pålidelighed.
- Alle reagenser, der leveres med QIASure-kittet, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme kit. Undlad at udskifte reagenser fra et kit med de samme reagenser fra et andet QIASure-kit, også selv om kittene er fra samme parti, da dette kan påvirke pålideligheden af resultatet.
- Se brugervejledningen til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet for at få flere oplysninger om advarsler, forholdsregler og procedurer.
- Foretag en opvarmningskørsel for Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM ved 95 °C i 10 minutter inden dagens første kørsel.
- Ændring af inkuberingstider og temperaturer kan resultere i forkerte eller afvigende data.
- Du må ikke anvende komponenter i kittet, som er udløbet, eller som ikke er blevet opbevaret på korrekt vis.
- Sørg for ikke at udsætte komponenterne for direkte lys, da reaktionsblandinger kan ændre sig som følge af eksponering.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre kontamination af blandingerne med de syntetiske materialer, der findes i PCR-reagenserne.
- Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.

Forholdsregler med hensyn til AssayManager-profiler

Forskellige prøvetyper kræver forskellige AssayManager-profiler. Sørg for at anvende den korrekte profil til hver af prøvetyperne som angivet nedenfor:

- "QIASure-analyseprofil til cervikale udskrabninger (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)" skal anvendes til testning af bisulfitkonverteret DNA indsamlet fra cervikale prøver taget af en læge
- "QIASure-analyseprofil til selvtagne vaginalbørsteprøver (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)" skal anvendes til testning af bisulfitkonverteret DNA indsamlet fra selvtagne vaginalbørsteprøver

Opbevaring og håndtering af reagenser

Forsendelsesbetingelser

QIASure Methylation Test forsendes på tøris. Hvis nogle af komponenterne i QIASure Methylation Test ikke er frosne ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en følgeseddel, håndbøger eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til en af QIAGENs afdelinger for teknisk service eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Opbevaringsforhold

QIASure Methylation Test skal straks efter modtagelse opbevares ved -30 til -15 °C i en fryser med konstant temperatur og beskyttes mod lys.

Stabilitet

Når QIASure Methylation Test opbevares under de specifikke opbevaringsbetingelser, er det stabilt indtil den udløbsdato, der er anført på æsken.

Når de er åbnet, kan reagenser opbevares i deres originale emballage ved -30 til -15 °C. Undgå gentagen optøning og nedfrysning. Et reagens må højst indfrysnes og optøs 3 gange.

- Bland forsigtigt ved at vende rørene på hovedet 10 gange, og centrifuger alle rør, før de åbnes.
- Udløbsdatoen for de enkelte reagenser er angivet på de individuelle komponentmærkater. Under de korrekte opbevaringsforhold bevarer produktet sin stabilitet, så længe der anvendes komponenter fra samme parti.

Prøvehåndtering og -opbevaring

FORSIGTIG



Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Cervikale prøver

QIASure-kittet er beregnet til bisulfitkonverterede genomiske DNA-prøver indsamlet fra cervikale prøver. De validerede indsamlingsmedier til cervikale prøver (udskrabninger) er PreservCyt®-indsamlingsmedie, SurePath™-indsamlingsmedie og *Digene* Specimen Transport Medium (STM). Den optimale opbevaringstemperatur for de kliniske prøver er 2-8 °C efter ankomst til laboratoriet. Under disse opbevaringsforhold er prøver i indsamlingsmediet PreservCyt eller SurePath™ stabile i 3 måneder før DNA-ekstraktion.

Bemærk: Cervikale prøver i STM må forsendes ved 2-30 °C ved dag-til-dag-levering til testlaboratoriet og genfryses til -20 °C ved modtagelse.

Selvtagne vaginalbørsteprøver

QIASure Methylation Test er beregnet til bisulfitkonverterede genomiske DNA-prøver ekstraheret fra selvtagne vaginale børsteprøver. Selvtagne vaginalbørsteprøver kan indsamles og forsendes tørt og kan efter ankomsten til laboratoriet opbevares i et PreservCyt-indsamlingsmedie med en anbefalet opbevaringsvolumen på 2-3 ml. Prøver i indsamlingsmediet PreservCyt må opbevares ved 2-8 °C eller stuetemperatur i maksimalt 3 måneder.

Genomiske DNA-prøver

Efter ekstraktion af genomisk DNA må DNA-prøver opbevares og forsendes ved -30 til -15 °C i maksimalt 12 måneder.

Klargøring af prøver, som opbevares i PreservCyt

QIASure Methylation Test er valideret til brug med bisulfitkonverteret genomisk DNA fra cervikale prøver. Bisulfitkonvertering af genomisk DNA må udføres:

- i) med forudgående ekstraktion og kvalitetskontrol af DNA fra prøverne eller
- ii) direkte på den cervikale prøve ved brug af EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, kat.-nr. 59720) eller
- iii) direkte på den cervikale prøve ved brug af QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN, kat.-nr. 931106).

Vores anbefaling er angivet nedenfor.

- i) Bisulfitkonvertering med forudgående DNA-ekstraktion og -kvalitetskontrol
Denne protokol forudsætter DNA-ekstraktion, DNA-koncentrationsmåling og efterfølgende opdeling af den optimale eluatvolumen i alikvoter, inden bisulfitkonverteringsprotokollen startes. Protokollen er godkendt til brug sammen med EZ DNA Methylation™ Kit (kat.-nr. D5001) og EZ DNA Methylation-Lightning Kit (kat.-nr. D5030) fra ZYMO Research. Vi anbefaler følgende metoder:
 - DNA-ekstraktion
Standard-DNA-ekstraktionskits (f.eks. kits baseret på kolonner og magnetiske kugler) er kompatible med QIASure Methylation Test.
 - Måling af DNA-koncentration
Mål DNA-koncentrationen før bisulfitkonverteringen af DNA. Systemer, der egner sig til DNA-koncentration, omfatter bl.a. Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (begge fra Thermo Fisher Scientific) eller tilsvarende.
 - Opdeling af DNA-eluat
Det optimale DNA-input til bisulfitkonvertering spænder fra 100 ng til 2 µg. Til bisulfitkonvertering anbefales 200 ng. Hvis DNA-koncentrationen er for lav til

bisulfitkonvertering, gentages DNA-ekstraktionen med en større inputvolumen af den kliniske prøve, eller DNA-elueringsvolumenen reduceres.

- Bisulfitkonvertering med EZ DNA Methylation Kit og EZ DNA Methylation-Lightning Kit udføres i henhold til producentens anbefalinger.

Bemærk: Ifølge EZ DNA Methylation Kit må den maksimale mængde prøve-DNA ikke overstige 2 µg for at opnå en tilstrækkeligt høj konverteringseffektivitet (> 98 %).

- ii) Bisulfitkonvertering direkte på cervikal prøve med EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit
Bisulfitkonvertering, som udføres direkte på en cervikal prøve, der er indsamlet i PreservCyt® Solution, er godkendt til brug sammen med EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit fra QIAGEN. Vi henviser til *håndbogen EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion* vedrørende høje koncentrationer af DNA-prøver (fra 1 ng til 2 µg) i henhold til producentens anbefalinger, undtagen i forbindelse med følgende:
 - Trin 1 i protokollen. Udtag 2,5 % af den cervikale prøve i PreservCyt®-indsamlingsmediet (dvs. 500 µl fra 20 ml), og dan pellets ved centrifugering i 10 minutter ved min. 3390 x g. Kassér supernatanten, og lad cellepelleten blive ved maksimalt 20 µl PreservCyt-indsamlingsmedie. Brug denne cellepelletprøve til bisulfitkonverteringsreaktionen, og fortsæt til trin 2 i producentens protokol.
 - Buffer BL: Tilsæt ikke carrier-RNA.
 - Elueringsmængden af det bisulfitkonverterede DNA er 50 µl Buffer EB for hver prøve.
- iii) Bisulfitkonvertering direkte på cervikal prøve med QIAasymphony Bisulfite Kit
Bisulfitkonvertering, som udføres direkte på en cervikal prøve, der er indsamlet i PreservCyt® Solution, er godkendt til brug sammen med QIAasymphony Bisulfite Kit fra QIAGEN. Vi henviser til *håndbogen til QIAasymphony Bisulfite Kit*, og testning skal udføres i henhold til producentens anbefalinger.
 - Udtag 2,5 % af den cervikale prøve i PreservCyt®-indsamlingsmediet (dvs. 500 µl fra 20 ml), og dan pellets ved centrifugering i 10 minutter ved min. 3390 x g. Kassér supernatanten, og lad cellepelleten blive ved maksimalt 20 µl PreservCyt-indsamlingsmedie.

- Følg fremgangsmåden fra trin 2 i "Protokolark til QIAasympyphony SP – Bisulfite 140_HC_V" med hensyn til bisulfitkonverteringsreaktionen, og brug cellepelleten i stedet for DNA.
- Start en SP-kørsel på QIAasympyphony, når bisulfitkonverteringsreaktionen er fuldført, ved at følge den fremgangsmåde, der er beskrevet i protokollen "Bisulfitkonvertering af umethylerede cytosiner i forskellige prøvetyper" fra håndbogen til QIAasympyphony Bisulfite Kit. Der foretages elution i 40 µl.

Klargøring af prøver, som opbevares i SurePath™

Prøver, som opbevares i SurePath, skal forbehandles inden DNA-ekstraktion. QIAure Methylation Test er valideret til brug med bisulfitkonverteret genomisk DNA fra cervikale prøver i henhold til den procedure, der er beskrevet nedenfor.

- Udtag 2,5 % af den cervikale prøve.
- Centrifuger i 10 minutter ved 4000 g, og fjern supernatanten, men lad 100 µl SurePath™ blive.
- Tilsæt 100 µl buffer AL, og resuspender pelleten.
- Bland grundigt, og foretag inkubation i 20 minutter ved 90 °C.
- Lad indholdet afkøle i 5 min. ved stuetemperatur.
- Udfør DNA-ekstraktion ved brug af QIAamp DNA Mini Kit (eller tilsvarende) i henhold til producentens anvisninger, og foretag elution af DNA i 50 µl.
- Mål DNA-koncentrationen (egnede produkter til dette formål er Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (begge fra Thermo Fisher Scientific) eller tilsvarende).
- Det anbefales at bruge en volumen på 200 ng DNA til bisulfitkonvertering (brug den størst mulige volumen, hvis en volumen på 200 ng ikke er tilgængelig). Udfør konverteringen med EZ DNA Methylation Kit eller EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo) i henhold til producentens anvisninger. Brug 2,5 µL eluat til QIAure Methylation Test.

Generelle anbefalinger vedrørende bisulfitkonvertering

Den bisulfitkonverterede reaktion skal udføres på et andet sted, end hvor QIASure Master Mix opbevares og dispenseres for at undgå kontaminering af reagenserne.

Inputtet i QIASure-reaktionen er 2,5 µl bisulfitkonverteret DNA.

Hvis kvalitetskontrollen af den interne prøve er negativ (dvs. hvis ACTB C_T-værdierne er > 26,4), resulterede prøven af bisulfitkonverteret DNA i en utilstrækkelig mængde og/eller -kvalitet, og den er dermed ugyldig. Udfør de anbefalede trin for at opnå en ACTB C_T-værdi, der ligger inden for det gyldige område for følgende:

- Bisulfitkonvertering med forudgående DNA-ekstraktion og -kvantitetskontrol: Gentag bisulfitkonverteringsreaktionen med et højere input af prøve-DNA, og/eller gentag DNA-isolationen med et højere input af cervikal prøve
- Bisulfitkonvertering direkte på cervikal prøve: Gentag bisulfitkonverteringsreaktionen med 10 %* af den cervikale prøve i PreservCyt-indsamlingsmediet (dvs. 2 ml fra 20 ml).

Bisulfitkonverteret DNA kan opbevares i op til 24 timer ved 2-8 °C, op til 5 dage ved -25 til -15 °C og op til 3 måneder under -70 °C. Bisulfitkonverteret DNA må aldrig optøs gentagne gange. Antallet af optøningscyklusser må ikke overstige tre for at sikre en tilstrækkelig kvalitet.

* Prøvevolumenet til direkte bisulfitkonvertering kan øges i tilfælde af en utilfredsstillende succesrate pga. prøvevariabilitet, f.eks. som følge af utilstrækkelig prøvetagning.

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

Vigtige anvisninger før start

- Brug tid på at sætte dig ind i brug af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, før du starter protokollen. Se brugervejledningen til instrumentet (kat.-nr. 9002033 eller 9002032).
- Foretag en opvarmningskørsel for Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM ved 95 °C i 10 minutter inden dagens første kørsel.
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 muliggør automatisk tolkning af PCR-resultaterne. QIASure-kittet skal køres i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet ved brug af Rotor-Gene AssayManager v1.0. Brug tid på at sætte dig ind i brug af Rotor-Gene AssayManager v1.0 (kat.-nr. 9022739) og Epsilon Plug-In, og se desuden brugervejledningen til begge produkter.
- Hvilke Rotor-Gene AssayManager v1.0-analyseprofiler der skal anvendes, afhænger af prøvetyperne. Sørg for at anvende den korrekte profil til hver af prøvetyperne som angivet nedenfor:
 - "QIASure-analyseprofil til cervikale udskrabninger (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)" skal anvendes til testning af bisulfitkonverteret DNA indsamlet fra cervikale prøver taget af en læge
 - "QIASure-analyseprofil til selvtagne vaginalbørstestprøver (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)" skal anvendes til testning af bisulfitkonverteret DNA indsamlet fra selvtagne vaginalbørstestprøver

* Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med fremstillingsdato i januar 2010 eller senere. Produktionsdatoen findes under serienummeret på bagsiden af instrumentet. Serienummeret findes i formatet "mmåånnn", hvor "mm" står for produktionsmåneden i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den entydige instrumentidentifikator.

Bemærk: Det er kun muligt at teste én prøvetype pr. eksperiment. De individuelle analyseprofiler er optimeret efter prøvetype, og det er derfor nødvendigt, at kunden vælger den korrekte Assay Profile for at opnå optimale resultater for hver prøvetype.

Ting, der skal gøres før start

- Rotor-Gene AssayManager-software v1.0.x (hvor x er større end eller lig med 4) skal installeres på den computer, der er tilsluttet Rotor-Gene Q MDx. Se *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application* for at få oplysninger om installation af Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application-softwaren.
 - QIASure Methylation Test kræver et særligt plug-in ved navn "Epsilon Plug-in" (version 1.0.1 eller nyere). Dette plug-in kan downloades fra QIAGENs websted: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Dette plug-in skal installeres på en computer, hvor Rotor-Gene AssayManager version 1.0.x (hvor x er større end eller lig med 4) allerede er installeret.
 - QIASure Methylation Test forudsætter kørsel af en analysespecifik profil sammen med Rotor-Gene AssayManager v1.0-softwaren. Denne Assay Profile indeholder de parametre, der er nødvendige for at køre og analysere eksperimentet. Der findes 2 QIASure Assay Profiles:
 - "QIASure-analyseprofil til cervikale udskrabninger (fra filen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap)" svarer til lægeindsamlede cervikale prøver
 - "QIASure Assay Profile til selvtaget børsteprøve" (fra filen AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap)" svarer til selvtagne vaginale børsteprøver. Disse profiler kan downloades på QIASure Methylation Test-webstedet: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Analyseprofilen skal importeres i Rotor-Gene AssayManager-softwaren.
- Bemærk: QIASure-kittet kan kun køres, hvis de korrekte indstillinger er konfigureret i Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Af hensyn til systemmæssig processikkerhed skal følgende konfigurationsindstillinger angives for den lukkede tilstand:

- "Material number required" (Materialenummer påkrævet)
- "Valid expiry date required" (Gyldig udløbsdato påkrævet)
- "Lot number required" (Lotnummer påkrævet)

Installation af Epsilon Plug-in og import af analyseprofilen

Installation og import af Epsilon Plug-in og analyseprofilen er beskrevet i *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager Core Application* og *brugervejledningen til Epsilon Plug-In*.

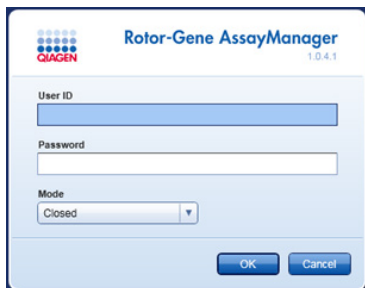
- Download både Epsilon Plug-in og den nyeste version af QIASure Assay Profile fra QIAGEN-webstedet.
- Start installationsprocessen ved at dobbeltklikke på filen ArtusBasic.Installation.msi, og følg installationsvejledningen. Se afsnittet "Installation af plug-ins" i *brugervejledningen til AssayManager Core Application* for at få en udførlig beskrivelse af denne proces.

Bemærk: Vælg fanen Settings (Indstillinger), og markér boksene ud for Material number required (Materialenummer påkrævet), Valid expiry date required (Gyldig udløbsdato påkrævet) og Lot number required (Lotnummer påkrævet) for den lukkede tilstand (arbejdslistesektion) af hensyn til systemmæssig processikkerhed. Klik for at aktivere dem, hvis disse ikke er aktiverede (markerede).

- Efter en vellykket installation af plug-in'et skal en person med administratorrettigheder til Rotor Gene AssayManager-softwaren importere analyseprofilen AP_QIASure_V1_0_Y.iap på følgende måde.

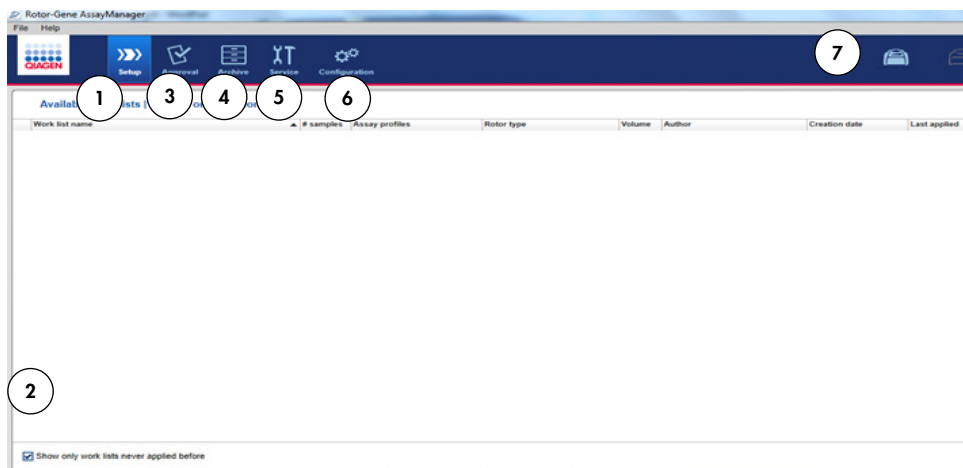


1. Åbn Rotor-Gene AssayManager-softwaren ved at klikke på ikonet. Rotor-Gene AssayManager-vinduet åbnes (se figur 1).



Figur 1. Rotor-Gene AssayManager-loginskærbilledet.

2. Log på Rotor-Gene AssayManager med dit brugernavn og din adgangskode. Undlad at ændre tilstanden "Closed" (Lukket). Klik på OK. Skærbilledet Rotor-Gene AssayManager vises (se nedenfor).



- 1 Fanen Set-up (Opsætning). Denne fane gør det muligt at håndtere eller anvende arbejdslistes.
- 2 Markering af anvendte arbejdslistes viser kun nye arbejdslistes.
- 3 Fanen Worklist (Arbejdsliste). Viser en rapport over en historikpost for hver fil, der er genereret af softwaren
- 4 Fanen Archive (Arkiv). Muliggør konfiguration af alle softwareparametre.
- 5 Fanen Service. Viser en rapport over en historikpost for hver fil, der er genereret af softwaren
- 6 Fanen Configuration (Konfiguration). Muliggør konfiguration af alle softwareparametre.
- 7 Fanen Help (Hjælp). Viser en rapport over en historikpost for hver fil, der er genereret af softwaren

3 Fanen Approval (Godkendelse). Ved hjælp af denne fane kan du finde tidligere eksperimenter (kørsler).

4 Fanen Archive (Arkiv). Gør det muligt for dig at finde gamle eksperimenter (kørsler), der allerede er godkendt.

7 Rotor-Gene Q MDx-ikoner.



Ikke tilsluttet



Tilsluttet

3. Vælg konfigurationsmiljøet.

4. Vælg fanen Assay Profiles (Analyseprofiler).

5. Klik på Import (Importér).

6. Vælg denne Assay Profile: AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap til cervikale prøver og/eller AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap, der skal importeres i dialogboksen, og klik på Open (Åbn).

7. Når analyseprofilen er importeret, kan den anvendes i miljøet "Setup" (Opsætning).

Bemærk: Samme version af en analyseprofil må ikke importeres to gange.

Prøvebehandling ved hjælp af Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med en 72-rotor

Ud over en kalibrator og ingen skabelonstyring kan der testes op til 70 bisulfitkonverterede DNA-prøver inden for samme eksperiment. Skemaet i tabel 1 indeholder et eksempel på isætningsblokken eller rotoropsætningen til en kørsel med QIASure Methylation Test. Tallene angiver positioner i isætningsblokken og indikerer den endelige rotorposition.

Tabel 1. Plade- og rotoropsætning til kørsel med QIASure-kittet vha. Rotor-Gene Q MDx-instrumentet

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

FORSIGTIG 	Rør skal indsættes i rotoren som angivet i tabel 1. Det automatiserede analysesæt i den pågældende Assay Profile er baseret på denne organisation. Hvis der anvendes et andet layout, opnås der afvigende resultater.
--	--

Bemærk: Opfyld alle ubrugte positioner med tomme rør.

PCR på Rotor-Gene Q MDx-instrumenter med 72-rørs-rotor

Foretag en opvarmningskørsel for Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM ved 95 °C i 10 minutter inden dagens første kørsel.

1. Opret en arbejdsliste for den prøve, der skal behandles, på følgende måde:

- 1a. Tænd Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.
- 1b. Åbn Rotor-Gene AssayManager-softwaren, og log på som bruger med operatørrollen i den lukkede tilstand.
- 1c. Klik på New work list (Ny arbejdsliste) i arbejdslisteoversigten (miljøet "Setup" (Opsætning)).
- 1d. Vælg QIASure Assay Profile (QIASure Analyseprofil) på listen over tilgængelige analyseprofiler.

Bemærk: Analyseprofilen AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap svarer til cervikale prøver, mens AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap svarer til selvtagne vaginale børsteprøver.

Bemærk: Det er kun muligt at teste én prøvetype pr. eksperiment.

- 1e. Klik på Move (Flyt) for at overføre den valgte analyseprofil til listen Selected assay profiles (Valgte analyseprofiler). Analyseprofilen vises nu på listen "Selected assay profiles" (Valgte analyseprofiler).
- 1f. Angiv antallet af prøver i det tilsvarende felt.
- 1g. Angiv følgende oplysninger om QIASure-kittet, som står på låget af æsken.
 - Materialenummer: 1102417
 - Gyldig udløbsdato i formatet ÅÅÅÅ-MM-DD
 - Lotnummer

- 1h. Vælg trinnet Samples (Prøver). En liste med yderligere oplysninger om prøverne vises på skærbilledet AssayManager. Denne liste repræsenterer det forventede layout af rotoren.
- 1i. Indtast prøveidentifikationsnummer/-numre i denne liste samt eventuelle valgfri prøveoplysninger såsom en kommentar til hver prøve.
- 1j. Vælg trinnet Properties (Egenskaber), og indtast et arbejdslistenavn (figur 2).

Figur 2. Properties (Egenskaber)

- 1k. Markér afkrydsningsfeltet is applicable (skal anvendes), og klik på Apply (Anvend).
- 1l. Gem arbejdslisten.

Arbejdslisten kan udskrives, hvilket kan være en hjælp ved klargøring og opsætning af PCR. Tryk på knappen Print work list (Udskriv arbejdsliste) for at udskrive arbejdslisten. Prøveoplysningerne medtages som en del af denne arbejdsliste.

Bemærk: Arbejdslisten kan oprettes, når kørslen er indstillet på instrumentet. Listen kan også gemmes, før du føjer prøverne til instrumentet.

2. Konfigurer QIASure-kørslen.

For at minimere risikoen for PCR-reaktionskontaminering anbefales det kraftigt, at du anvender et PCR-kabinet med UV-bestrålingsfunktion.

QIASure Master Mix skal blandes i et område, som er adskilt fra det område, der bruges til udførelsen af DNA-bisulfitkonverteringsreaktion.

Rengør arbejdsbordet, pipetter og rørracket før brug med en DNA-nedbrydende opløsning for at kontaminere af skabelonen eller af nukleasen.

Bemærk: Skift spidser mellem hvert rør for at undgå kontaminering på grund af en uspecifik skabelon eller en reaktionsblanding, der kan medføre falske positive resultater.

2a. Optør QIAzure Master Mix og QIAzure Calibrator fuldstændigt, og beskyt så vidt muligt QIAzure Master Mix mod sollys.

Bemærk: Overskrid ikke 30 minutter for optøningstrinnet for at undgå eventuel nedbrydning af materiale.

2b. Bland forsigtigt ved invertering 10 gange, og centrifuger kortvarigt før brug.

2c. Dispensér 17,5 µl af den brugsklare QIAzure Master Mix i de relevante striprør. Reaktionsopsætningen må udføres ved stuetemperatur.

2d. Sæt QIAzure Master Mix tilbage i fryseren for at undgå nedbrydning af materiale.

2e. Flyt rørene til et særskilt område for at dispensere analysekontrollerne og de bisulfitkonverterede prøver.

2f. Tilsæt 2,5 µl vand til ikke-skabelonkontrollen (no template control, NTC) til position 2 (se tabel 1 ovenfor). Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.

2g. Tilsæt 2,5 µl QIAzure Calibrator til position 1 (se tabel 1 ovenfor). Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned, og luk røret med en hætte.

2h. Tilsæt 2,5 µl af det bisulfitkonverterede DNA i det tilsvarende rør. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.

2i. Sæt hætter på rørene, når du har fyldt et sæt med 4 rør.

Bemærk: PCR-rørene kan opbevares mørkt ved 2-8 °C i 30 minutter i tidsrummet fra pipettering af prøverne i PCR-rørene til eksperimentstart i maskinen.

2j. Sæt QIAzure Calibrator tilbage i fryseren for at undgå nedbrydning af materiale.

Bemærk: Skift spidser mellem hvert rør for at undgå kontaminering på grund af en uspecifik skabelon eller en reaktionsblanding, der kan medføre falske positive resultater.

3. Klargør Rotor-Gene Q MDx, og start en kørsel (eksperimentet) på følgende måde:

3a. Anbring en rotor med 72 brønde på rotorholderen.

3b. Fyld rotoren med striprør i henhold til de tildelte positioner, startende ved position 1, som vist i Tabel 1 med tomme striprør med låg i alle positioner, der ikke skal anvendes.

Bemærk: Sørg for, at det første rør er sat i position 1, og at striprørene er anbragt i den rigtige retning og position som vist i tabel 1.

3c. Montér låseringen.

3d. Sæt rotoren og låseringen i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og luk instrumentlåget.

3e. Vælg den tilhørende arbejdsliste på arbejdslisteoversigten i Rotor-Gene AssayManager v1.0-softwaren, og klik på Apply (Anvend), eller klik på Apply (Anvend), hvis arbejdslisten stadig er åben.

Bemærk: Hvis der ikke er oprettet en arbejdsliste til kørslen, kan du logge på Rotor-Gene AssayManager v1.0 og følge anvisningerne i trin 1, før du fortsætter.

3f. Indtast navnet på kørslen (eksperimentet).

3g. Vælg den cykler, der skal anvendes, på listen Cycler selection (Vælg cykler).

3h. Vælg korrekt montering af låsering, og bekræft på skærmen, at låseringen er monteret.

3i. Klik på Start experiment (Start eksperiment).

Nu burde QIASure Methylation Test-kørslen starte.

4. Når kørslen er afsluttet, skal du klikke på Finish run (Afslut kørsel).

5. Frigiv og godkend kørslen.

- En bruger, der er logget ind med rollen Approver (Godkender), skal klikke på Release and go to approval (Frigiv og fortsæt til godkendelse).
- En bruger, der er logget ind med rollen Operator (Operatør), skal klikke på Release (Frigiv).

6. Resultater af frigivelse.

- Hvis der klikkes på Release and go to approval (Frigiv og fortsæt til godkendelse), vises resultaterne for eksperimentet.
- Hvis der klikkes på Release (Frigiv) af en bruger med brugerrolle, skal en bruger med rollen "Approver" (Godkender) logge ind og vælge miljøet "Approval" (Godkendelse).
- Filtrer analysen, der skal godkendes ved at vælge filtreringsindstillingerne og klikke på Apply (Anvend).
- Gennemgå og godkend resultaterne af hver enkelt testprøve.

Naviger til den prøve, der skal godkendes på tabellen "Results" (Resultater). De prøveresultater, som skal godkendes, har tre alternativknapper for enden af deres række. Accepter eller afvis hvert prøveresultat.

Bemærk: Et resultat, der automatisk indstilles til INVALID (Ugyldigt) af Rotor-Gene AssayManager, kan ikke længere konverteres til et gyldigt resultat, heller ikke selv om resultatet afvises.

Valgfrit: Indtast en kommentar i kolonnen "Sample comment" (Prøvekommentar).

- Klik på Release/Report data (Frigiv/rapportér data).
- Klik på OK. Rapporten genereres i Adobe Portable Document-format (.pdf) og gemmes automatisk i den foruddefinerede mappe. Mappestien er som standard: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports**.

Bemærk: Denne sti og mappe kan ændres i miljøet "Configuration" (Konfiguration).

- Gå til Archive (Arkiv) for at eksportere .rex-filen med rådata. Find dit eksperiment vha. filtreringen, og klik på Show assays (Vis analyser). Klik derefter på filen Export.rex, og gem den ved at klikke på OK. Softwaren gemmer automatisk .rex-filen i denne foruddefinerede mappe: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**.

Bemærk: Denne sti og mappe kan ændres på fanen Specify the .rex file export destination (Angiv eksportdestination for .rex-fil).

Bemærk: Der kræves en supportpakke fra kørslen til fejlsøgning. Supportpakker kan genereres fra miljøerne Approval (Godkendelse) eller Archive (Arkiv). Læs mere i *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager Core Application*, afsnittet "Troubleshooting" (Fejlsøgning), "Creating a support package" (Oprettelse af en supportpakke) her: <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Desuden kan historikposten fra hændelsestidspunktet ± 1 dag være nyttig. Historikposten kan hentes i miljøet "Service" (*brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager Core Application*).

7. Tøm Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, og kassér striprørene i henhold til de lokale sikkerhedsregler.

Fortolkning af resultater

Analysen er helt automatisk.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analyserer først amplifikationskurver og ugyldiggør muligvis ikke-konforme kurver afhængigt af deres udformning og støjamplitude. I så fald knyttes der et flag til den ugyldiggjorte kurve (se tabel 2).

Derefter analyserer Rotor-Gene AssayManager v1.0 kørselskontrollerne.

- Kalibrator
- NTC

Bemærk: Den rapport, der genereres efter kørslen, viser de resultater, der er opnået på kørselskontroller med ugyldiggørende flag foran ugyldige data.

Hvis alle kontrollerne i kørslen er i overensstemmelse, analyserer Rotor-Gene AssayManager de ukendte prøver.

I tabel 2 ses de ugyldiggørende prøveflag, et rør kan blive tildelt i forbindelse med den analyse, der foretages af Rotor-Gene AssayManager v1.0, sammen med en forklaring af hvert enkelt flags betydning.

Tabel 2. Ugyldiggørende prøveflag og beskrivelse af udtryk

Flag	Adfærd	Beskrivelse
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ugyldig)	Målværdien er højere end det definerede område. Dette kan være en C_T , endepunktsfluorescens-, koncentrations- eller beregningsværdi, f.eks. C_T eller ΔC_T -middelværdi.
ASSAY_INVALID (ANALYSE_UGYLDIG)	Invalid (Ugyldig)	Analysen er ugyldig, fordi mindst én ekstern kontrol er ugyldig.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ugyldig)	Målværdien er lavere end det definerede område. Dette kan være en C_T , endepunktsfluorescens-, koncentrations- eller beregningsværdi, f.eks. C_T eller ΔC_T -middelværdi.
CONSECUTIVE_FAULT (KONSEKUTIV_FEJL)	Invalid (Ugyldig)	Målet, der anvendes til beregningen af dette mål, er ugyldigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (KURVEFORM_UNORMAL)	Invalid (Ugyldig)	Rådataene for forstærkningskurven har en facon der afviger fra den fastlagte adfærd for denne analyse. Der er en høj sandsynlighed for forkerte resultater eller fejlfortolkning af resultater.
FLAT_BUMP (FLAD_BULE)	Invalid (Ugyldig)	Rådataene for forstærkningskurven har en facon som ligner en flad bule og afviger fra den fastlagte adfærd for denne analyse. Der er stor sandsynlighed for ukorrekte resultater eller fejlfortolkning af resultater (f.eks. forkert bestemmelse af C_T -værdi).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Gyldig)	NTC viser C_T -signalværdier over 36 for mål-ACTB.
INVALID_CALCULATION (UGYLDIG_BEREGNING)	Invalid (Ugyldig)	Beregningen for dette mål mislykkedes.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (MANGE_TÆRSKELOVERGANGE)	Invalid (Ugyldig)	Amplifikationskurven krydser tærsklen mere end én gang. En utvetydig C_T -værdi kan ikke fastslås.
NO_BASELINE (INGEN_BASELINE)	Invalid (Ugyldig)	Der er ikke fundet nogen første baseline.
NO_CT_DETECTED (Ingen C_T påvist)	Variabel	Ingen C_T -værdi blev påvist for dette mål.
NO_VALUE	Invalid (Ugyldig)	Målet har ingen værdi, men forventes at have en. Denne værdi behøver ikke at ligge inden for et bestemt område. Dette kan være en C_T , endepunktsfluorescens-, koncentrations- eller beregningsværdi (f.eks. C_T eller ΔC_T -middelværdi).
NORM_FACTOR_ALTERATION (Ændring af normaliseringsfaktor)	Advarsel	Afvigelse under normaliseringsproceduren. Forstærkningskurven vises med en standardnormalisering. Resultaternes korrekthed skal kontrolleres manuelt.

OTHER_TARGET_INVALID (ANDET_MÅL_UGYLDIGT)	Invalid (Ugyldig)	Et andet mål for den samme prøve er ugyldigt.
SATURATION (MÆTNING)	Invalid (Ugyldig)	Rådatafluorescensen mættes kraftigt før forstærkningskurvens knæpunkt.
SATURATION_IN_PLATEAU (Mætning på plateau)	Advarsel	Rådatafluorescensen mættes i forstærkningskurvens plateauafase.
SPIKE (SPIDS)	Advarsel	En spids i rådatafluorescensen blev påvist i amplifikationskurven, men uden for det område, hvor C_T -værdien bestemmes.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (SPIDS_TÆT_PÅ_CT)	Invalid (Ugyldig)	En spids blev påvist i amplifikationskurven tæt på C_T .
STEEP_BASELINE (MARKANT_BASELINE)	Invalid (Ugyldig)	En skarp stigning i baseline for rådatafluorescensen er påvist i forstærkningskurven.
STRONG_BASELINE_DIP (STÆRKT_BASELINE_FALD)	Invalid (Ugyldig)	Et skarpt fald i baseline for rådatafluorescensen er påvist i forstærkningskurven.
STRONG_NOISE (KRAFTIG_STØJ)	Invalid (Ugyldig)	Kraftig støj blev påvist uden for vækstfasen af amplifikationskurven.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (KRAFTIG_STØJ_I_VÆKSTFASE)	Invalid (Ugyldig)	Kraftig støj blev påvist i vækstfasen (eksponentiel) af forstærkningskurven.
UNCERTAIN	Variabel	Resultater fra AUDAS er i modstrid med resultaterne fra kerneanalysen. En utvetydig, automatisk evaluering af dataenes gyldighed er ikke mulig.
UNEXPECTED_CT_DETECTED (UVENTET_CT_REGISTRERET)	Variabel	En C_T -værdi blev påvist for et mål, som ikke må forstærkes.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Ugyldig)	Målet har en værdi, men den er ikke som forventet. Dette kan være en C_T , endepunktsfluorescens-, koncentrations- eller beregningsværdi, f.eks. C_T eller ΔC_T -middelværdi.
UPSTREAM	Variabel	Prøvestatus blev indstillet til Invalid (Ugyldig) eller Unclear (Uklar) af en upstreamproces (f.eks. QIASymphony). Bemærk: For prøver, der markeres som Unclear (Uklar), er Rotor-Gene AssayManagers adfærd defineret i miljøet "Configuration" (Konfiguration) i AssayManager-softwaren. Flaget "Invalid" (Ugyldig) fra upstream-processer resulterer altid i en ugyldig tilsvarende prøve i Rotor-Gene AssayManager.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (BØLGEFORMET_BASISFLUORESCENS)	Invalid (Ugyldig)	En bølgeformet baseline for rådatafluorescensen er påvist i forstærkningskurven.

- Hvis alle kontrollerne i kørslen er gyldige, analyserer Rotor-Gene AssayManager v1.0 de ukendte prøver. Prøven skal indeholde en minimal mængde af bisulfitkonverteret DNA, for at resultaterne kan fortolkes. Dette angives ved C_T -værdien af husholdningsgenet ACTB, der skal være $\leq 26,4$, for at en prøve kan valideres af Rotor-Gene AssayManager.
- Derefter beregnes $\Delta\Delta C_T$ -værdierne for *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*, og resultatet præsenteres. Hvis en $\Delta\Delta C_T$ -værdi er under grænseværdien, får målet bedømmelsen "Hypermethylation positive" (Hypermetyleringspositiv).
Bemærk: Delvise eller lave niveauer af methylering er et naturligt fænomen, der i modsætning til hypermethyleringsniveauer ikke direkte skyldes cancerudvikling.
- En prøve anses som værende "Hypermethylation positive" (Hypermetyleringspositiv), når mindst ét af målene bedømmes sådan.
- Prøver med lav DNA-kvalitet/kvantitet (dvs. ACTB C_T -værdier, der akkurat er inden for godkendelseskriteriet; C_T -værdier fra 25 til 26,4) kan bedømmes som falsk negative. Gentaget testning af PCR i enkeltprøver anbefales. Et negativt resultat i gentagelsestesten betyder, at prøven er hypermethyleringsnegativ, mens et positivt resultat betyder, at prøven er hypermethyleringspositiv.
- For prøver med højt celletal, som behandles med en protokol for direkte konvertering, er der risiko for at overbelaste PCR-reaktionen med DNA, hvilket kan føre til et falsk negativt resultat for *FAM19A4*-målet. For prøver med 1) et negativt hypermethyleringsresultat, 2) en ACTB- C_T -værdi på ≤ 23 og 3) en $\Delta\Delta C_T$ -værdi for *FAM19A4* på mellem 10,36 og 11,36 anbefales det derfor at gentage PCR med 5 gange mindre input af konverteret DNA ved at fortynde prøven i vand.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. Yderligere information kan også fås på siden med ofte stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores center for teknisk support: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGEN Teknisk Service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Se *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager Core Application* for at få oplysninger om fejlsøgning vedrørende Rotor-Gene AssayManager.

Kommentarer og forslag

Generel håndtering

Koncentrationen af DNA i prøven er for lav til bisulfitkonvertering

Kontrollér DNA-ekstraktionen	Gentag DNA-ekstraktionen, men med en mere koncentreret klinisk prøve
------------------------------	--

Prøven har fået bedømmelsen ugyldig: ACTB-forstærkningen er for lav eller fraværende

- | | |
|--|--|
| a) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser | Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen. |
| b) Kontrollér DNA-koncentratet | Maksimer DNA-inputtet til bisulfitkonvertering. Bisulfitkonverteringsreaktionen har optimal stabilitet ved DNA-input mellem 100 ng og 2 µg |
| c) Kontrollér den kliniske prøves celletal i forbindelse med protokollen "Bisulfite-conversion directly on cervical specimen" (Bisulfitkonvertering direkte på cervikal prøve) | Gentag bisulfitkonverteringsreaktionen med 10 % af den cervikale prøve i PreservCyt-indsamlingsmediet (dvs. 2 ml fra 20 ml). |
| d) Kontrollér det bisulfitkonverterede eluat | Gentag bisulfitkonverteringen, evt. med et højere DNA-input. |

Prøven bedømmes ugyldig: Målene *FAM19A4* og/eller *hsa-mir-124-2* er ugyldige

Utilstrækkelig blanding	Bland prøve- og reaktionsblanding vha. pipettering (ca. 10 gange pr. rør). Gentag prøven.
-------------------------	--

Kommentarer og forslag

Den positive kontrol er ugyldig: forstærkningen er for lav eller fraværende for et eller flere af målene

a) Pipetteringsfejl eller udeladte reagenser	Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen.
b) Delvis nedbrydelse	Opbevar kittets indhold ved -30 til -15 °C. Undgå at nedfryse og optø mere end maksimalt tre cyklusser.
c) PCR-reagenser delvist nedbrudt	Opbevar kittets indhold ved -30 til -15 °C, og beskyt reaktionsblandingerne mod direkte lys. Undgå gentagen nedfrysning og optøning.
d) Ombytning af stripør	Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.
e) Udløbsdato	Kontrollér udløbsdatoen for det anvendte kit.
f) Tidsforsinkelse mellem pipetteringsprøver og starten på kørslen	PCR-reaktionsblandinger kan opbevares mørkt ved 2-8 °C i 30 minutter i tidsrummet fra dispensering af prøver i PCR-reaktionerne til kørselsstart i maskinen.

Ikke-skabelon-kontrol (No template control, NTC) er ugyldig

a) Pipetteringsfejl	Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen.
b) Krydskontaminering	Udskift alle kritiske reagenser. Håndter altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer iht. almindeligt accepterede fremgangsmåder for at forhindre kontaminering ved overførsel.
c) Reagenskontaminering	Udskift alle kritiske reagenser. Håndter altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer iht. almindeligt accepterede fremgangsmåder for at forhindre kontaminering ved overførsel.
d) Ombytning af stripør	Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.
e) Tidsforsinkelse mellem pipetteringsprøver og starten på kørslen	PCR-reaktionsblandinger kan opbevares mørkt ved 2-8 °C i 30 minutter i tidsrummet fra dispensering af prøver i PCR-reaktionerne til kørselsstart i maskinen.
f) Probeforringelse	Beskyt reaktionsblandinger mod lys. Kontrollér for falsk-positive værdier på fluorescenskurven.

Fraværende eller lave signaler på prøven, men kontrolkørslen er OK

a) Hæmmende påvirkninger	Kontrollér altid, at der ikke er bufferrester efter centrifugering i filteret, når du kører bisulfittkonvertering. Gentag bisulfittkonverteringen.
b) Pipetteringsfejl	Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Gentag PCR-kørslen.

Hvis problemet ikke er afhjulpet, skal du kontakte QIAGENs tekniske service.

Begrænsninger

Reagenser i QIASure Methylation Test må kun anvendes til in vitro-diagnostik.

Brug af PCR-test kræver god laboratoriepraksis, herunder vedligeholdelse af udstyr, der er dedikeret til molekylærbiologi, og som overholder gældende lovgivning og relevante standarder.

Reagenser og vejledning, der medfølger i dette sæt, er valideret til optimal pålidelighed.

QIASure Methylation Test må kun anvendes af laboratoriepersonale, som er uddannet i brugen af Rotor-Gene Q MDx-instrumenterne og Rotor-Gene AssayManager v1.0.

Produktet må kun anvendes af personale, som er specielt instrueret og uddannet i teknikkerne til real-time PCR og in vitro-diagnostiske procedurer. De diagnostiske resultater, der genereres, skal fortolkes sammen med andre kliniske resultater eller laboratorieresultater.

Det er absolut nødvendigt, at anvisningerne i brugervejledningen overholdes nøje for at opnå optimale PCR-resultater.

Bemærk nøje udløbsdatoerne, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Brug aldrig for gamle komponenter.

Prøver med lav DNA-kvalitet/kvantitet (dvs. ACTB C_T -værdier, der akkurat er inden for godkendelseskriteriet; C_T -værdier fra 25 til 26,4) kan bedømmes som falsk negative. Gentaget testning af enkeltprøver anbefales. Et negativt resultat i gentagelsestesten betyder, at prøven er hypermethyleringsnegativ, mens et positivt resultat betyder, at prøven er hypermethyleringspositiv.

Alle reagenser, der leveres med QIASure Methylation Test, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme test. Ellers kan dette påvirke nøjagtigheden.

QIASure Methylation Test er valideret til HPV-positive kvinder.

QIASure Methylation Test er valideret til cervikale prøver, der indsamles og opbevares i PreservCyt- SurePath™- eller STM-medie, og til selvtagne vaginale børsteprøver, der indsamles og opbevares i PreservCyt ved ankomsten til laboratoriet.

Kun Rotor-Gene Q MDx er valideret til brug sammen med QIASure Methylation Test PCR-analysen.

Enhver brug til andre formål end de tiltænkte af dette produkt og/eller komponentændringer gør, at Self-screen B.V.'s garanti bortfalder.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af Self-screens resultatundersøgelser.

Ydelseskarakteristik

Påvisningsgrænse (LOD, Limit of Detection)

Analysesensitiviteten for QIASure Methylation Test blev fastlagt som en påvisningsgrænse (Limit of Detection, LOD) på 95 % ud fra en fortyndingsserie af plasmid, som indeholder alle tre amplikonsekvenser (dvs. *ACTB*, *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*; område: 750.000 til 0,25 kopier pr. PCR). Målenes 95 %-LOD blev vurderet som den laveste plasmidfortynding, hvilket gav mindst 35 ud af 36 positive resultater ($C_T < 40$). Fire forskellige operatører udførte i alt 12 eksperimenter (1 kørsel pr. operatør pr. dag) med tre forskellige lots og tre forskellige RGQ-systemer. Hvert eksperiment omfattede testning in triplo af 11 plasmidfortyndinger. 95 %-LOD'en gav 7,5 kopier pr. PCR for alle tre forskellige mål.

Linearitet

Lineariteten af QIASure-analysen blev fastlagt ud fra dataene fra de 12 eksperimenter, der blev udført for at vurdere 95 % LOD. De to mål, *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*, samt reference-*ACTB* udviser en lineær amplifikation fra 750.000 op til 7,5 kopier pr. PCR.

Præcision

Præcisionen af QIASure Methylation Test blev fastlagt som intraanalysevariabiliteten (variabilitet af flere prøveresultater med samme koncentration inden for samme eksperiment) og den samlede varians i analysen (variabilitet af flere analyseresultater genereret af forskellige operatører på forskellige instrumenter med forskellige batches på forskellige laboratorier). Testen blev udført på bisulfittkonverteret DNA fra en cervikal prøve med høj HPV-positiv-risiko, der testede hypermethyleringspositiv med signaler for både *FAM19A4* og *hsa-mir124-2*, hvilket svarer til ca. 3 gange LOD-koncentrationen. Testen blev udført in duplo i løbet af 8 kørsler udført af fire forskellige brugere (én kørsel pr. bruger pr. dag) med to forskellige lots og tre forskellige RGQ-maskiner på to forskellige laboratorier, hvilket gav

16 datapunkter pr. prøve. Variationskoefficienten (coefficient of variation, CV) blev fastlagt for C_T - og $\Delta\Delta C_T$ -værdierne (tabel 3).

Tabel 3. CV% af C_T - og $\Delta\Delta C_T$ -værdier i en metyleringspositiv cervical prøve

	Prøvetype	Prøvetype (%)	Prøvetype (%)
CT-værdi	Kvalitetskontrol af intern prøve (dvs. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
$\Delta\Delta C_T$ værdi	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Den samlede statistiske spredning i en prøves C_T -værdier med den førnævnte koncentration er 1,32 % for kvalitetskontrollen af den interne prøve (ACTB), 1,52 % for *FAM19A4* og 1,64 % for *hsa-mir124-2*. Den samlede statistiske spredning i en prøves $\Delta\Delta C_T$ -værdier med den førnævnte koncentration er 5,97 % for *FAM19A4* og 5,75 % for *hsa-mir124-2*.

Interfererende stoffer

De hæmmende stoffer, der er udvalgt pga. deres potentielle indvirkning på PCR, er desulfonerings- og vaskebufferen i bisulfitkonverterings-kittet. Der blev ikke testet for stoffer, som muligvis kunne være til stede i den oprindelige prøve, eftersom prøve-DNA oprensnes to gange med silicaperler, dvs. DNA-ekstraktion fra den oprindelige prøve og DNA-rensning efter bisulfitkonvertering. Rester af desulfonerings- og vaskebufferen vidnede om interferens i PCR og blev påvist i form af et ugyldigt testresultat i kvalitetskontrollen af den interne prøve.

Klinisk ydeevne

HPV-positive cervikale prøver*

Den kliniske ydeevne for QIASure Methylation Test i forbindelse med cervikal intraepitelial neoplasie grad 3 (CIN 3) og cervikal cancer (dvs. CIN 3+) blev vurderet i en retrospektiv undersøgelse på flere undersøgelsescentre i EU (13). QIASure Methylation Test blev vurderet i 2384 HPV-positive cervikale screeningprøver indsamlet fra kvinder (i alderen 29-76 år) i fire EU-lande (Skotland, Slovenien, Danmark og Holland)(13). Prøverne blev indsamlet i PreservCyt- eller SurePath-medie. Undersøgelsespopulationen bestod af 2012 kvinder, som ikke viste tegn på sygdom ved opfølgning inden for 2 år (forkortet som $\leq$ CIN 1), 124 med CIN 2, 228 med CIN 3 og 20 med cancer. Der blev ekstraheret DNA fra de cervikale prøver, og 250 ng DNA blev anvendt som input i bisulfidkonverteringsreaktionen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Ud af de 250 ng modificeret DNA blev 20 % anvendt i PCR (svarende til 50 ng af det oprindelige mål-DNA/PCR). De generelle positivitetsfrekvenser for QIASure Methylation Test stratificeret efter klinisk endepunkt kan ses nedenfor (tabel 4).

Tabel 4. Positivitetsfrekvenser for QIASure Methylation Test

Klinisk endepunkt	Fraktion	Positivitetsfrekvens (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)
Cervikal cancer	19/20	95,0 % (70,7-99,3)

Blandt de cervikale prøver med høj risiko for HPV er følsomheden for CIN 3+ 78,6 % (195/248; 95 % CI: 73,1-88,3), og den generelle specificitet for QIASure Methylation Test var 78,3 % (n = 2013; 95 % CI: 76-80). Den negative prædiktive værdi for hrHPV-positive, metyleringsnegative resultater var 99,9 % for cervikal cancer (N = 1694; 95 % CI: 99,6-99,99), 96,9 % for CIN3+ (95 % CI: 96-98) og 93,0 % for CIN2+ (95 % CI: 92-94).

Derudover blev sensitiviteten for cervikal cancer vurderet i en verdensomspændende retrospektiv undersøgelse på flere undersøgelsescentre ved undersøgelse af 519 invasive

* Lægeindsamlede cervikale prøver.

cancere med forskellige histotyper fra over 25 lande (11). Der blev ekstraheret DNA fra de cervikale prøver, og 250 ng DNA blev anvendt som input i bisulfitkonverteringsreaktionen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Ud af de 250 ng modificeret DNA blev 20 % anvendt i PCR (svarende til 50 ng af det oprindelige mål-DNA/PCR). 510 ud af de 519 cancers testede positive med QIASure Methylation Test, hvilket gav en positivitetsfrekvens på 98,3 % (95 % CI: 96,7-99,2), og positivitetsfrekvenserne stratificeret efter histotype kan ses i tabel 5. Positivitetsfrekvens for QIASure Methylation Test i cervikale cancerprøver.

Tabel 5. Positivitetsfrekvens for QIASure Methylation Test i cervikale cancerprøver

Klinisk endepunkt	Fraktion	Positivitetsfrekvens (95 % CI)
Pladeepitelcarcinom	313/318	98,4 % (96,4-99,5)
Adenokarcinom	121/123	98,4 % (94,2-99,8)
Adenopladeepitelcarcinom	42/42	100,0 % (91,6-100)
Sjældne cancerhistotyper	30/32	93,8 % (79,2-99,2)
Uspecificet cancerhistotype	4/4	100 % (39,8-100,0)

HPV-positive selvtagne vaginale børsteprøver

I forbindelse med selvtagne vaginale børsteprøver blev QIASure Methylation Tests kliniske ydeevne ved påvisning af cervical intraepitelial neoplasie, grad 3 samt cervical cancer (dvs. CIN 3+) bedømt ud fra en test af 247 vaginalprøver med høj HPV-risiko. 14 prøver (5,7 %) viste ACTB C_T-værdier > 26,4 og blev derfor bedømt ugyldige. Prøverne med gyldige testresultater bestod af 148 selvtagne børsteprøver fra kvinder med ≤ CIN 1 efter 18 måneder med opfølgende undersøgelser, 24 med CIN 2, 50 med CIN 3, 8 med pladeepitelcarcinom og 3 med adenokarcinom. Der blev ekstraheret DNA fra vaginalprøverne, og 250 ng DNA blev anvendt som input i bisulfitkonverteringsreaktionen (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Ud af de 250 ng bisulfitkonverteret DNA blev 20 % anvendt i PCR (svarende til 50 ng af det oprindelige mål-DNA/PCR). Positivitetsfrekvenserne for QIASure Methylation Test stratificeret efter klinisk endepunkt kan ses nedenfor (tabel 6).

Tabel 6. Positivitetsfrekvenser for QIASure Methylation Test i selvtagne vaginalbørsteprøver

Klinisk endepunkt	Fraktion	Positivitetsfrekvens (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)
Pladeepitelcarcinom	8/8	100,0 % (63,1-100,0)
Adenokarcinom	3/3	100,0 % (29,2-100,0)

Blandt selvtagne vaginale børsteprøver med høj HPV-risiko er sensitiviteten for CIN 3+ 72,1 % (44/61; 95 % CI: 59,7-81,9), og sensitiviteten for karcinom er 100 % (11/11; 95 % CI: 72-100).*

FAM19A4- og hsa-mir124-2-genernes evne til at påvise fremskredne og transformerende CIN-læsioner

En analyse af promoter-methylering påviser specifikt såkaldte "fremskredne" CIN-læsioner, der gemmer på en cancerlignende methyleringsprofil og har en høj risiko på kort sigt for at føre til cancer (7, 8). Pålideligheden af promoter-hypermethyleringsanalysen af *FAM19A4* og *hsa-mir124-2* blev vurderet ved at teste 29 højrisiko-HPV-positive prøver fra kvinder med fremskreden og transformerende CIN 2/3 og 19 højrisiko-HPV-positive prøver fra kvinder med tidlige stadier af transformerende CIN 2/3. Methylering forbindes især med fremskreden sygdom og testes positiv på alle fremskredne CIN 2/3-læsioner (100 %; 29/29; 95 % CI: 88-100) sammenlignet med 47 % (9/19; 95 % CI: 27-69) af tidlige CIN 2/3-læsioner.

Robusthed

Robustheden af QIASure Methylation Test blev vurderet ud fra overensstemmelsen mellem outputtet af QIASure Methylation Test og outputtet af analyseversionen, som kun er til forskningsbrug (Research Use Only, RUO). Vurderingen blev udført på bisulfitkonverteret genomisk DNA indsamlet fra 10 cervikale prøver i højrisikogruppen for HPV, hvoraf 5 tidligere

* Bemærkning: Hypermethylering af målene i prøverne fra kvinder med fremskredne CIN-læsioner og/eller cervical cancer kan undslippe påvisning pga. variabilitet i prøvetagningen, f.eks. som følge af utilstrækkelig prøvetagning.

er påvist hypermethyleringsnegative for begge markører, og 5 tidligere er påvist methyleringspositive (dvs. for mindst én af de 2 markører). Testen blev udført in duplo i løbet af 8 kørsler udført af fire forskellige brugere (én kørsel pr. bruger pr. dag) med to forskellige lots og tre forskellige Rotor-Gene Q MDx-instrumenter på to forskellige laboratorier. Dette resulterede i i alt 16 datapunkter pr. prøve (tabel 7).

Tabel 7. Overensstemmelse mellem QIASure Methylation Test og RUO-versionen af analysen

Prøvenummer	RUO resultat	Overensst. ml. lab. 1 og RUO	Overensst. ml. lab. 2 og 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)
Subtotal		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)
Subtotal		100 % (40/40)	100 % (40/40)

Fire af de fem prøver, der tidligere er påvist methyleringsnegative, viste 100 % overensstemmelse, når QIASure Methylation Test blev vurderet på begge laboratorier. Prøve 3 viste en overensstemmelse på 62,5 % (5/8) på begge laboratorier. Den observerede variation var relateret til *FAM19A4* med niveauer omkring analyse-cutoff. Den samlede overensstemmelse mellem de methyleringsnegative prøver var 92,5 % (37/40).

Alle 5 prøver, der tidligere er påvist methyleringspositive, viste 100 % overensstemmelse med referenceanalysen, dvs. en samlet overensstemmelse på 100 % (40/40).

Bisulfitkonvertering direkte på cervikale prøver

Protokollen "Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit" (Bisulfitkonvertering direkte på cervikale prøver ved brug af EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit) blev godkendt i forhold til referenceprotokollen (dvs. bisulfitkonvertering med forudgående kvantitetskontrol af prøve-DNA) på 119 cervikale udskrabninger efterfulgt af QIASure Methylation Test. Succesraten for bisulfitkonvertering direkte på cervikale prøver med et cervikalprøveinput på 2,5 % var 95,8 % (114/119). Dette steg til 100 % efter gentestning af de ugyldige resultater med et cervikalprøveinput på 10 %. Overensstemmelsen mellem QIASure Methylation Test-resultaterne af de bisulfitkonverterede protokoller var 90,8 % (108/119; kappa-værdi 0,75).

Protokollen "Bisulfite-conversion directly on cervical specimens using the QIAAsymphony Bisulfite Kit" (Bisulfitkonvertering direkte på cervikale prøver ved brug af QIAAsymphony Bisulfite Kit) blev godkendt i forhold til referenceprotokollen (dvs. bisulfitkonvertering med forudgående kvantitetskontrol af prøve-DNA) på 120 cervikale udskrabninger efterfulgt af QIASure Methylation Test. Succesraten for bisulfitkonvertering direkte på cervikale prøver med et cervikalprøveinput på 2,5 % var 94,2 % (113/120) sammenlignet med 97,5 % (117/120) med referenceprotokollen. Overensstemmelsen mellem QIASure Methylation Test-resultaterne af de bisulfitkonverterede protokoller var 94,7 % (107/113; kappa-værdi 0,88).

Litteraturhenvisninger

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

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

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
	Holdbarhedsdato
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	CE-IVD-symbol
	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
Rn	R står for revision af brugsanvisningen (håndbog), og n står for revisionsnummeret
	Globalt handelsvarenummer
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Beskyt mod direkte lys



Læs brugervejledningen



Forsigtig

Kontaktoplysninger

Du kan få teknisk bistand og yderligere information i vores center for teknisk support på adressen www.qiagen.com/Support, ved at ringe til os på 00800-22-44-6000 eller ved at kontakte QIAGEN Teknisk Service eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
QIASure Methylation Test Kit	Til 72 reaktioner: 2 × Master Mix, 2 × kalibrator.	616014
QIASymphony SP	QIASymphony-modul til klargøring af prøver: inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn (valgfrit ved automatiseret ekstraktion)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse ikke inkluderet	9002032

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
Tilbehør til Rotor-Gene Q MDx		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion med en etkanalspipette i 72 x 0,1 ml-rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 bånd a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
Rotor-Gene AssayManager – til rutinetest med Rotor-Gene Q MDx-instrumenter		
Rotor-Gene AssayManager	Software til rutinetest i kombination med Rotor-Gene Q- og QIA Symphony RGQ-instrumenterne; software med enkeltbrugerlicens til installation på én computer	9022739

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser kan ses i håndbogen eller brugsvejledningen til det aktuelle QIAGEN-kit. Håndbøger og brugervejledninger til QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale distributør.

Denne side er bevidst tom.

Revisionshistorik for dokumentet

Dato	Ændringer
R4, juni 2019	Reviderede organisationsdiagrammet for arbejdsgangproceduren under Princip og procedure; tilføjede EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit under Påkrævede materialer, der ikke medfølger; reviderede indholdet af tekstboksen Sikkerhedsinformation; tilføjede oplysninger om opvarmningskørsel af RGQ MDx 5-plex HRM; reviderede afsnittet Prøveklargøring; tilføjede punkt i fejlsøgningsafsnittet; tilføjede emnet Bisulfitkonvertering direkte på cervikale prøver under Ydelseskarakteristik; opdaterede Referencer; opdaterede layout.
R5, juli 2023	QIAsymphony-instrumenter til valgfri automatiseret ekstraktion og QIAsymphony Bisulfite Kit er blevet tilføjet i afsnittet "Nødvendige materialer, som ikke medfølger", afsnittet "Klargøring af prøve" er blevet revideret, brug af SurePath-indstillingsmedie er blevet tilføjet, og afsnittet "Klinisk ydeevne" er blevet revideret. Der er tilføjet overskrifter for tabel 5 og tabel 6.

Aftale om begrænset licens til QIASure Methylation Test

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit og/eller brugen af det ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt, der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne dertil.

Vedrørende opdaterede licensbetingelser henvises der til www.qiagen.com.

QIASure Methylation Test produceres af Self-screen B.V.

QIASure Methylation Test produceres af Self-screen B.V. og forhandles af QIAGEN i Europa.

Varemærker: 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); PreservCy® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.). Registrerede navne, varemærker osv. anvendt i dette dokument, selv når de ikke specifikt er markeret som sådan, skal ikke betragtes som værende juridisk ubeskyttede.

07-2023 HB-2304-005 1132288DA © 2023, QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

Bestilling: www.qiagen.com/shop | Teknisk support: support.qiagen.com | Websted: www.qiagen.com