

Juli 2023

# QIAzure™ Methylation Test

## Gebrauchsanweisung (Handbuch)



### Version 1

Zur Verwendung mit dem Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM Gerät



616014



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



1132288DE

# Inhalt

Verwendungszweck .....	4
Zusammenfassung und Erläuterung .....	5
Verfahrensprinzip .....	5
Im Lieferumfang enthaltene Materialien .....	7
Kit-Inhalt .....	7
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien .....	7
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen .....	10
Sicherheitshinweise .....	10
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen .....	10
Vorsichtsmaßnahmen in Bezug auf das AssayManager-Profil .....	12
Lagerung und Handhabung der Reagenzien .....	13
Lagerung und Handhabung der Proben .....	14
Probenvorbereitung für in PreservCyt gelagerte Proben .....	15
Probenvorbereitung für in SurePath™ gelagerte Proben .....	18
Allgemeine Empfehlungen für die Bisulfit-Konvertierung .....	19
Protokoll: PCR des QIASure Methylation Test im Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler .....	20
Interpretation der Ergebnisse .....	32
Hilfe zur Fehlerbehebung .....	37
Grenzen .....	39
Leistungsmerkmale .....	41
Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) .....	41

Linearität .....	41
Präzision .....	41
Störsubstanzen .....	42
Klinische Leistungsmerkmale .....	43
Robustheit .....	46
Literatur .....	48
Symbole .....	50
Kontakt .....	51
Bestellinformationen .....	52
Bearbeitungshistorie des Dokuments .....	55

# Verwendungszweck

Beim QIASure Methylation Test (Kat.-Nr. 616014) handelt es sich um einen methylierungsspezifischen real-time Multiplex-PCR-Assay für den Nachweis von Promotor-Hypermethylierung in den Genen *FAM19A4* und *hsa-mir124-2*. Zu den Proben, die mit dem QIASure Methylation Test getestet werden können, gehört Bisulfit-konvertierte DNA aus Proben, die auf folgende Weise gewonnen wurden:

- Mit dem *digene*® HC2 DNA Collection Device gewonnene Zervixproben (vom Arzt entnommen)
- Mit einer bürstenartigen Entnahmevorrichtung in PreservCyt® Solution oder SurePath™ Solution gewonnene Zervixproben (vom Arzt entnommen)
- Mit einer bürstenartigen Entnahmevorrichtung gewonnene vaginale Proben (selbst entnommen)

Anwendungsgebiete:

1. Als Folgetest für Frauen mit einem positiven Test auf humane Papillomviren (HPV) zur Bestimmung, inwieweit eine Überweisung für eine Kolposkopie oder ein anderes Verfahren zur Nachkontrolle erforderlich ist.
2. Als Folgetest für Frauen mit einem auffälligen Pap-Test-Ergebnis mit atypischen Plattenepithelzellen unbestimmter Signifikanz (ASC-US) zur Bestimmung, inwieweit eine Überweisung für eine Kolposkopie oder ein anderes Verfahren zur Nachkontrolle erforderlich ist.

Dieses Produkt darf nur von Fachpersonal wie z. B. technischen Assistenten und Labormitarbeitern verwendet werden, die in Verfahren der In-Vitro-Diagnostik, molekularbiologischen Techniken sowie dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System geschult sind.

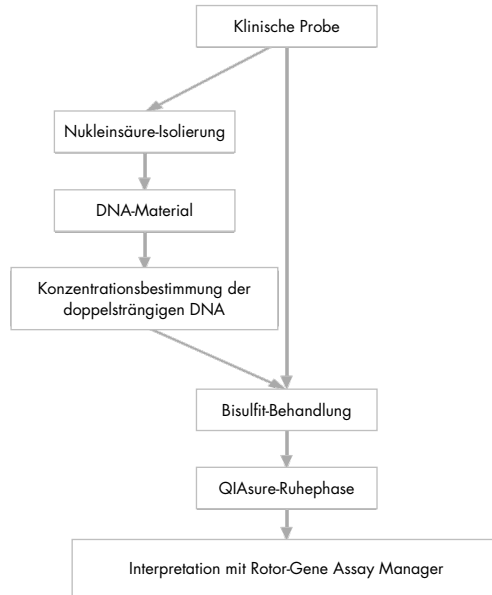
# Zusammenfassung und Erläuterung

Die DNA-Methylierung ist ein biochemischer Vorgang, der für die normale Entwicklung höherer Organismen von großer Bedeutung ist (1). Dabei wird an die 5. Position des Pyrimidinrings des Nukleotids Cytosin eine Methylgruppe angelagert. Anomale DNA-Methylierungsmuster spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese. Bei mehreren humanen Karzinomen und malignen Zelllinien, darunter Zervix- und Endometriumkarzinom, fand sich eine Promotor-Hypermethylierung der Gene *FAM19A4* (Family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like) member A4) und/oder *hsa-mir124-2* (homo sapiens micro RNA 124-2) (2-6). Die Methylierungsanalyse von Wirtszell-Promotoren ermöglicht den spezifischen Nachweis von Krebserkrankungen und sogenannten „fortgeschrittenen“ intraepithelialen Zervixneoplasien (zervikale intraepitheliale Neoplasie, CIN), die sich durch ein tumorartiges Methylierungsprofil auszeichnen und mit einem hohen Risiko der kurzfristigen Entartung einhergehen (3, 7, 8, 10, 11, 12, 14). Der QIASure-Assay ermöglicht den Nachweis von Promotor-Hypermethylierung der Gene *FAM19A4* und *hsa-mir124-2* in Bisulfit-konvertierter DNA, die mittels ACTB (humanes  $\beta$ -Actin-Gen) als interne Probenqualitätskontrolle aus Zervix- oder vaginalen Proben isoliert wurde.

## Verfahrensprinzip

Beim QIASure Methylation Test handelt es sich um einen real-time Multiplex-PCR-Test zur Amplifikation der methylierten Promotor-Regionen in den Tumorsuppressorgenen *FAM19A4* und *hsa-mir124-2* sowie eines methylierungs-unspezifischen Fragments eines Referenzgens. Das Kit enthält 2 Röhrchen QIASure Master Mix und 2 Röhrchen des QIASure Calibrator. Der Master-Mix dient zur Amplifikation der Bisulfit-konvertierten DNA, die aus klinischen Proben gewonnen wurde. Der Master-Mix enthält die Primer und Sonden für die Zielgene und das Referenzgen, das als interne Probenqualitätskontrolle dient. Beim Kalibrator handelt es sich um ein linearisiertes Plasmid, das Sequenzen der *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* und ACTB-Amplifikate enthält.

## Arbeitsablauf



Der QIASure-Assay wird auf dem Rotor-Gene Q MDx Gerät durchgeführt. Datenanalyse und -interpretation erfolgen automatisch mit der Rotor-Gene AssayManager® Software. Der  $C_T$ -Wert (Zyklusschwellenwert) stellt die Anzahl der PCR-Zyklen dar, die für den Nachweis eines Fluoreszenzsignals über einem Hintergrundsignal erforderlich sind. Das Fluoreszenzsignal entspricht dabei der Anzahl der Zielmoleküle in der Probe. Beim QIASure-Assay wird der  $\Delta C_T$ -Wert berechnet, also die Differenz zwischen dem  $C_T$ -Wert der *FAM19A4*- oder *hsa-mir124-2*-Ziele und dem  $C_T$ -Wert der Referenz (ACTB). Dieser  $\Delta C_T$ -Wert ist ein relativer quantitativer Wert für den Promotor-Methylierungsgrad des Gens *FAM19A4* oder *hsa-mir124-2*. Der  $\Delta C_T$ -Wert einer Kalibratorprobe wird zur Normalisierung vom  $\Delta C_T$ -Wert der *FAM19A4*- oder *hsa-mir124-2*-Ziele subtrahiert: Das Ergebnis ist der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert [9]. Beim Kalibrator handelt es sich um eine standardisierte DNA-Probe aus Low-copy-Plasmiden, bei der die Kopienzahl der drei Ziele (d. h. *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* und ACTB) bekannt ist.

# Im Lieferumfang enthaltene Materialien

## Kit-Inhalt

QIAzure Methylation Test		72
Katalog-Nr.		616014
Anzahl der Reaktionen		72
QIAzure Master Mix (2 Röhrchen)	Braunes Röhrchen	630 µl
QIAzure Calibrator (2 Röhrchen)	Transparentes Röhrchen	25 µl
QIAzure Methylation Test		1
Gebrauchsanweisung (Handbuch)		

# Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

## Verbrauchsmaterialien und Reagenzien zur Probenvorbereitung für selbst entnommene Proben

- Hologic PreservCyt® Solution (Hologic)

## Reagenzien zur Vorbereitung der im SurePath-Entnahmemedium gelagerten Proben.

- Buffer AL (QIAGEN Katalognummer: 19075)

## Verbrauchsmaterialien und Reagenzien zur Bisulfit-Konvertierung

Geprüfte Bisulfit-Konvertierungskits sind z. B.:

- EZ DNA Methylation Kit (ZYMO Research, Kat.-Nr. D5001 oder Kat.-Nr. D5002)
- EZ DNA Methylation-Lighting (ZYMO Research, Kat.-Nr. D5030 oder Kat.-Nr. D5031)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 59720)
- QIAsymphony Bisulfite Kit (QIAGEN Kat.-Nr. 931106)

## Verbrauchsmaterialien für den Rotor- Gene Q MDx Thermocycler

- Strip tubes and Caps, 0.1 mL (Kat.-Nr. 981103)
- Reinstwasser (z. B. Molekularbiologie-Qualität, entionisiert oder destilliert)

## Ausstattung/Geräte

- Einstellbare Pipetten\* für die PCR (1–10 µl, 10–100 µl)
- Einmal-Handschuhe
- Tischzentrifuge\* mit einer Drehzahl > 10.000 rpm
- Vortexer\*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorespectrometer (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. ND-3300) oder gleichwertig
- QIAsymphony SP System (Kat.-Nr. 9001297) zur optionalen automatisierten Extraktion und/oder Bisulfit-Konvertierung

\* Stellen Sie sicher, dass die Instrumente gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.



## Ausrüstung für die Real-time PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (Kat.-Nr. 9002033) oder Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler (Kat.-Nr. 9002032)\*
- Rotor-Gene AssayManager Core Application Software, Version 1.0.x (dabei ist  $x \geq 4$ )
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in installiert, Version 1.0.x (dabei ist  $x \geq 1$ )
- QIASure Assay Profile (aus Datei AP\_QIASure\_CervicalScrape\_V1\_0\_Y.iap) (dabei ist  $Y \geq 1$ ) für Bisulfit-konvertierte DNA, die aus von Ärzten entnommenen Zervixproben gewonnen wurde
- QIASure Assay Profile für selbst entnommene Bürstenproben (aus der Datei AP\_QIASure\_SelfCollectedBrush\_V1\_0\_Y.iap) (dabei ist  $Y \geq 0$ ) zur Anwendung an Bisulfit-konvertierter DNA, die aus selbst entnommenen vaginalen Bürstenproben gewonnen wurde

\* Rotor-Gene Q 5plex HRM Thermocycler mit Herstellungsdatum ab Januar 2010. Das Produktionsdatum kann der Seriennummer an der Rückseite des Instruments entnommen werden. Die Seriennummer hat das Format „mmjjnnn“, wobei „mm“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „jj“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „nnn“ für die eindeutige Instrumentenkenennung steht.

# Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Nur für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

## Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) finden Sie zu jedem QIAGEN® Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

### QIASURE MASTER MIX



Enthält: 1,2,4-Triazol: Gefahr! Steht in Verdacht, die Fruchtbarkeit zu beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib zu schädigen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

## Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Die Durchführung von PCR-Tests setzt eine gute Laborpraxis voraus. Dazu gehört die Wartung der Ausrüstung, die ausschließlich für molekularbiologische Anwendungen zu verwenden ist und den Anforderungen aller geltenden Vorschriften und relevanten Standards gerecht wird.

Achten Sie stets auf folgende Punkte:

- Tragen Sie beim Arbeiten mit den Proben puderfreie Handschuhe, einen Laborkittel und Augenschutz.

- Eine Kontamination der Proben und des Kits mit Mikroben und Nuklease (DNase) ist zu vermeiden. DNase kann zur Zersetzung des DNA-Templates führen.
- Eine Kontamination der DNA oder des PCR-Produkts durch Verschleppung, die zu einem falsch positiven Signal führen kann, ist zu vermeiden.
- Verwenden Sie stets DNase-freie Einweg-Pipettenspitzen mit Aerosolfilter.
- Die Reagenzien des QIASure-Assays werden in einer optimalen Verdünnung bereitgestellt. Die Reagenzien dürfen nicht weiter verdünnt werden, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann.
- Alle im QIASure Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus demselben Kit vorgesehen. Die Reagenzien von einem Kit dürfen nicht durch die gleichen Reagenzien eines anderen QIASure-Kits ersetzt werden, selbst wenn sie aus der gleichen Charge stammen, da dies die Leistung beeinträchtigen könnte.
- Weitere Informationen zu Warnungen, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren finden Sie im Benutzerhandbuch des Rotor-Gene Q MDx Thermocyclers.
- Vor dem ersten Lauf des Tages muss der Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM bei 95 °C 10 Minuten lang aufgewärmt werden.
- Die Veränderung der Inkubationszeiten und -temperaturen kann zu falschen oder nicht übereinstimmenden Daten führen.
- Bestandteile des Kits, deren Verfallsdatum abgelaufen ist oder die falsch gelagert wurden, dürfen nicht verwendet werden.
- Die Bestandteile dürfen möglichst keinem Licht ausgesetzt werden, da Licht die Reaktionsgemische beeinträchtigen kann.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Gemische mit synthetischem Material zu vermeiden, das in den PCR-Reagenzien enthalten ist.
- Proben- und Assayabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

## Vorsichtsmaßnahmen in Bezug auf das AssayManager-Profil

Für die verschiedenen Probenotypen werden unterschiedliche AssayManager-Profile benötigt. Stellen Sie sicher, dass für den zu testenden Probenotyp wie im Folgenden beschrieben das richtige Profil ausgewählt ist:

- Zum Testen von Bisulfit-konvertierter DNA, die aus von Ärzten entnommenen Zervixproben gewonnen wurde, muss das folgende Assay-Profil verwendet werden: QIASure Assay-Profil für Zervikalabstriche, (aus Datei AP\_QIASure\_CervicalScrape\_V1\_0\_Y.iap).
- Zum Testen von Bisulfit-konvertierter DNA, die aus selbst entnommenen vaginalen Bürstenproben gewonnen wurde, muss das folgende Assay-Profil verwendet werden: QIASure Assay-Profil für selbst entnommene vaginale Bürstenproben (aus Datei AP\_QIASure\_SelfCollectedBrush\_V1\_0\_Y.iap).

# Lagerung und Handhabung der Reagenzien

## Transportbedingungen

Der QIAzure Methylation Test wird auf Trockeneis versendet. Wenn Bestandteile des QIAzure Methylation Test beim Empfang nicht gefroren sind, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde, die Lieferung keine Stückliste, keine Handbücher oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Lagerungsbedingungen

Der QIAzure Methylation Test muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei  $-30$  bis  $-15$  °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden.

## Stabilität

Bei Lagerung unter den angegebenen Lagerungsbedingungen ist der QIAzure Methylation Test bis zum Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums stabil.

Die Reagenzien können nach dem Öffnen bei  $-30$  bis  $-15$  °C in der Originalverpackung gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. 3 Einfrier-/Auftauzyklen dürfen nicht überschritten werden.

- Alle Röhrchen vor dem Öffnen durch zehnmaliges Umschwenken mischen und zentrifugieren.
- Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des jeweiligen Reagenzes angegeben. Die Leistungsmerkmale des Produkts bleiben bei Verwendung der vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen über den Haltbarkeitszeitraum erhalten. Es müssen jedoch Komponenten aus der gleichen Charge verwendet werden.

# Lagerung und Handhabung der Proben

## VORSICHT



Alle Proben müssen als potenziell infektiöses Material behandelt werden.

## Zervixproben

Das QIASure-Kit ist für Bisulfit-konvertierte genomische DNA-Proben vorgesehen, die aus Zervixproben gewonnen wurden. Zu den validierten Entnahmemedien für Zervixproben (Abstriche) gehören PreservCyt® Entnahmemedium, SurePath™ Entnahmemedium und *Digene* Specimen Transport Medium (STM). Die optimale Lagertemperatur für klinische Proben nach dem Eintreffen im Labor beträgt 2–8 °C. Proben in PreservCyt- oder SurePath™-Entnahmemedium sind vor der DNA-Extraktion unter diesen Lagerungsbedingungen bis zu 3 Monate lang stabil.

**Hinweis:** Zervixproben in STM können bei Übernachtzustellungen bei 2–30 °C zum Testlabor gesendet und nach dem Empfang bei –20 °C erneut eingefroren werden.

## Selbst entnommene vaginale Bürstenproben

Der QIASure Methylation Test ist für Bisulfit-konvertierte genomische DNA-Proben vorgesehen, die aus selbst entnommenen vaginalen Bürstenproben gewonnen wurden. Selbst entnommene vaginale Bürstenproben können trocken entnommen und versandt und bei Ankunft im Labor mit einem empfohlenen Lagervolumen von 2–3 ml in PreservCyt-Entnahmemedium gelagert werden. Proben in PreservCyt-Entnahmemedium können bei 2–8 °C oder Raumtemperatur bis zu 3 Monate lang gelagert werden.

## Genomische DNA-Proben

DNA-Proben können nach Extraktion der genomischen DNA bei –30 bis –15 °C versendet und bis zu 12 Monate lang gelagert werden.

# Probenvorbereitung für in PreservCyt gelagerte Proben

Der QIASure Methylation Test wurde für Bisulfit-konvertierte genomische DNA validiert, die aus Zervixproben gewonnen wurde. Die Bisulfit-Konvertierung genomischer DNA kann durchgeführt werden:

- i) nach vorangegangener DNA-Extraktion und DNA-Qualitätskontrolle oder
- ii) direkt mit der Zervixprobe mit dem EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 59720) oder
- iii) direkt mit der Zervixprobe mit dem QIASymphony Bisulfite Kit (QIAGEN Kat.-Nr. 931106).

Nachstehend finden Sie unsere Empfehlung.

- i) Bisulfit-Konvertierung nach vorangegangener DNA-Extraktion und DNA-Qualitätskontrolle  
Dieses Protokoll erfordert die DNA-Extraktion, Messung der DNA-Konzentration sowie eine anschließende Aliquotierung des optimalen Eluatvolumens, bevor mit dem Protokoll der Bisulfit-Konvertierung begonnen werden kann. Es wurde für das EZ DNA Methylation™ Kit (Kat.-Nr. D5001) und das EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Kat.-Nr. D5030) von ZYMO Research verifiziert. Wir empfehlen die folgenden Vorgehensweisen:
  - DNA-Extraktion  
Standardmäßige DNA-Extraktionskits (z. B. Kits auf Basis von Säulen und Magnetpartikeln) sind mit dem QIASure Methylation Test kompatibel.
  - DNA-Konzentrationsmessung  
Bestimmen Sie vor der Bisulfit-Konvertierung der DNA die DNA-Konzentration. Geeignete Systeme zur Bestimmung der DNA-Konzentration sind das Qubit®-Fluorometer, das NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (beide von Thermo Fisher Scientific) oder gleichwertige Systeme.

- Aliquotieren des DNA-Eluats

Die optimale DNA-Aufgabemenge für die Bisulfit-Konvertierung liegt zwischen 100 ng und 2 µg. Empfohlen werden 200 ng. Wenn die DNA-Konzentration für die Bisulfit-Konvertierung zu niedrig ist, wiederholen Sie die DNA-Extraktion mit einem größeren Aufgabevolumen der klinischen Probe oder eluieren Sie die DNA in einem kleineren Elutionsvolumen.

- Die Bisulfit-Konvertierung mit dem EZ DNA Methylation Kit und dem EZ DNA Methylation-Lightning Kit ist gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchzuführen.

Hinweis: Die maximale Aufgabenmenge von Proben-DNA sollte gemäß den Anweisungen des EZ DNA Methylation Kit 2 µg nicht überschreiten, um eine ausreichend hohe Konvertierungseffizienz (> 98 %) zu gewährleisten.

- ii) Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben mit dem EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit

Die Bisulfit-Konvertierung direkt an den in PreservCyt® Solution entnommenen Zervixproben wurde für das EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit von QIAGEN verifiziert. Wir verweisen auf das Handbuch *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion Handbook* für hochkonzentrierte DNA-Proben (1 ng – 2 µg) gemäß der Empfehlung des Herstellers, mit Ausnahme der folgenden Punkte:

- Schritt 1 des Protokolls. 2,5 % der Zervixprobe in PreservCyt®-Entnahmemedium (d. h. 500 µl aus 20 ml) durch zehnmünütige Zentrifugation bei mindestens 3.390 x g pelletieren. Den Überstand verwerfen, sodass das Zellpellet in maximal 20 µl PreservCyt-Entnahmemedium zurückbleibt Diese Zellpellet-Probe für die Bisulfit-Konvertierungsreaktion verwenden und mit Schritt 2 des Herstellerprotokolls fortfahren.
- Buffer BL: Keine Carrier-RNA zugeben.
- Das Elutionsvolumen der DNA nach erfolgter Bisulfit-Konvertierung beträgt für jede Probe 50 µl Buffer EB.



- *iii) Bisulfit-Konvertierung direkt an der Zervixprobe mit dem QIASymphony Bisulfite Kit*  
 Die Bisulfit-Konvertierung direkt an den in PreservCyt® Solution entnommenen Zervixproben wurde für das QIASymphony Bisulfite Kit von QIAGEN verifiziert. Wir beziehen uns auf das Handbuch des QIASymphony Bisulfite Kit, und die Tests werden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.
  - 2,5 % der Zervixprobe in PreservCyt®-Entnahmemedium (d. h. 500 µl aus 20 ml) durch zehnminütige Zentrifugation bei mindestens 3.390 x g pelletieren. Den Überstand verwerfen, sodass das Zellpellet in maximal 20 µl des verbleibenden PreservCyt-Entnahmemediums zurückbleibt.
  - Für die Bisulfit-Konvertierungsreaktion folgen Sie dem „QIASymphony SP Protokollblatt - Bisulfit 140\_HC\_V“, beginnend mit Schritt 2, und verwenden Sie statt der DNA das Zellpellet.
  - Nach Abschluss der Bisulfit-Konvertierungsreaktion starten Sie einen SP-Lauf auf dem QIASymphony und folgen dabei den Schritten, die im Protokoll „Bisulfit-Konvertierung von unmethylierten Cytosinen in verschiedenen Probenarten“ im Handbuch des QIASymphony Bisulfite Kit beschrieben sind. Die Elution erfolgt in 40 µl.

# Probenvorbereitung für in SurePath™ gelagerte Proben

Die in SurePath gelagerten Proben müssen vor der DNA-Extraktion vorbehandelt werden. Der QIASure Methylation Test wurde für Bisulfit-konvertierte genomische DNA validiert, die aus Zervixproben gemäß dem nachstehenden Verfahren gewonnen wurde.

- Entnahme von 2,5 % der Zervixprobe
- 10 Minuten bei 4.000 g zentrifugieren, den Überstand entfernen, aber 100 µl SurePath™ belassen.
- 100 µl Buffer AL hinzugeben und das Pellet resuspendieren
- Gut durchmischen und 20 Minuten lang bei 90 °C inkubieren.
- 5 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Führen Sie die DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit (oder einem gleichwertigen Kit) gemäß den Anweisungen des Herstellers durch und eluieren Sie die DNA in 50 µl.
- Geeignete Systeme zur Bestimmung der DNA-Konzentration sind das Qubit® Fluorometer, das NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (beide von Thermo Fisher Scientific) oder gleichwertige Systeme.
- Für die Bisulfit-Konvertierung werden 200 ng DNA empfohlen. Sollten keine 200 ng verfügbar sein, verwenden Sie das maximale Aufgabevolumen. Führen Sie die Konvertierung mit dem EZ DNA Methylation Kit oder EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo) gemäß den Anweisungen des Herstellers durch. Für den QIASure Methylation Test werden 2,5 µl Eluat benötigt.

## Allgemeine Empfehlungen für die Bisulfit-Konvertierung

Die Bisulfit-Konvertierungsreaktion sollte in einem speziell dafür vorgesehenen Bereich durchgeführt werden, der von dem Bereich getrennt ist, in dem der QIASure Master Mix aufbewahrt und dispensiert wird, um eine Kontamination der Reagenzien vermeiden.

Das Aufgabevolumen für die QIASure-Reaktion beträgt 2,5 µl Bisulfit-konvertierter DNA.

Wenn die interne Probenqualitätskontrolle negativ ausfällt (d. h.  $C_T$ -Werte von ACTB > 26,4), wurde bei der Erzeugung Bisulfit-konvertierter DNA aus der Probe Material von unzureichender Qualität erlangt, das in Bezug auf die Menge und/oder Qualität nicht geeignet und somit ungültig ist. Führen Sie für die folgenden Reaktionen die empfohlenen Schritte zum Erreichen eines  $C_T$ -Werts für ACTB innerhalb des zulässigen Bereichs durch:

- Bisulfit-Konvertierung nach vorangegangener DNA-Extraktion und DNA-Qualitätskontrolle: Wiederholen Sie die Bisulfit-Konvertierungsreaktion mit einer größeren Aufgabemenge von Proben-DNA und/oder wiederholen Sie die DNA-Isolierung mit einer größeren Aufgabemenge von Zervixproben
- Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben: Wiederholen Sie die Bisulfit-Konvertierungsreaktion mit 10 %\* der Zervixprobe in PreservCyt-Entnahmemedium (d. h. 2 ml aus 20 ml).

Bisulfit-konvertierte DNA kann bis zu 24 Stunden bei 2–8 °C, bis zu 5 Tage bei –25 bis –15 °C und bis zu 3 Monate unterhalb von –70 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Bisulfit-konvertierten DNA ist stets zu vermeiden. Um eine ausreichende Qualität zu gewährleisten, dürfen drei Einfrier-/Auftauzyklen nicht überschritten werden.

\* Das Probenvolumen für die direkte Bisulfit-Konvertierung kann vergrößert werden, wenn die Erfolgsquote aufgrund von Probenvariabilität (z. B. infolge inadäquater Probenentnahme) nicht zufriedenstellend ist.

# Protokoll: PCR des QIASure Methylation Test im Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler\*

## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Machen Sie sich mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Thermocycler ausreichend vertraut, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen. Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch des Thermocyclers (Kat.-Nr. 9002033 oder 9002032).
- Vor dem ersten Lauf des Tages muss der Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM bei 95 °C 10 Minuten lang aufgewärmt werden.
- Die Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software ermöglicht die automatisierte Interpretation der PCR-Ergebnisse. Das QIASure-Kit muss auf dem Rotor-Gene Q MDx Instrument mit der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software ausgeführt werden. Nehmen Sie sich die Zeit, um sich mit der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software (Kat.-Nr. 9022739) und dem Epsilon Plug-in vertraut zu machen. Verwenden Sie dazu die zugehörigen Benutzerhandbücher.
- Für die verschiedenen Probentypen werden unterschiedliche Rotor-Gene AssayManager v1.0 Assay-Profile benötigt. Stellen Sie sicher, dass für den zu testenden Probentyp wie im Folgenden beschrieben das richtige Profil ausgewählt ist:
  - Zum Testen von Bisulfit-konvertierter DNA, die aus von Ärzten entnommenen Zervixproben gewonnen wurde, muss das folgende Assay-Profil verwendet werden: „QIASure cervical scrapes Assay Profile“ (QIASure Assay-Profil für Zervikalabstriche, aus Datei AP\_QIASure\_CervicalScrape\_V1\_0\_Y.iap).
  - Zum Testen von Bisulfit-konvertierter DNA, die aus selbst entnommenen vaginalen Bürstenproben gewonnen wurde, muss das folgende Assay-Profil verwendet werden: QIASure Assay-Profil für selbst entnommene vaginale Bürstenproben (aus Datei AP\_QIASure\_SelfCollectedBrush\_V1\_0\_Y.iap).

\* Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument mit Produktionsdatum ab Januar 2010. Das Produktionsdatum kann der Seriennummer an der Rückseite des Instruments entnommen werden. Die Seriennummer hat das Format „mmjjnnn“, wobei „mm“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „jj“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „nnn“ für die eindeutige Instrumentenkenennung steht.

Hinweis: Pro Analyse kann nur ein Probentyp getestet werden. Die verschiedenen Assay-Profile wurden für den jeweiligen Probentyp optimiert. Daher muss unbedingt das richtige Assay-Profil ausgewählt werden, um für den jeweiligen Probentyp optimale Ergebnisse zu erhalten.

## Vorbereitende Schritte

- Auf dem Computer, an den das Rotor-Gene Q MDx Instrument angeschlossen ist, muss die Rotor-Gene AssayManager Software, Version v1.0.x (dabei ist  $x \geq 4$ ) installiert sein. Detaillierte Informationen zur Installation der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application-Software finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application Handbuch*.
- Für den QIASure Methylation Test wird das sogenannte „Epsilon Plug-in“ (Version 1.0.1 oder höher) benötigt. Dieses Plug-in kann von der QIAGEN-Website heruntergeladen werden: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Dieses Plug-in muss auf einem Computer installiert werden, auf dem bereits die Rotor-Gene AssayManager Software, Version 1.0.x (dabei ist  $x \geq 4$ ) installiert ist.
- Für den QIASure Methylation Test muss ein assay-spezifisches Profil mit der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software ausgeführt werden. Dieses Assay-Profil enthält alle Parameter, die für Cycling und Analyse benötigt werden. Es gibt 2 QIASure Assay Profiles:
  - Das Assay-Profil „QIASure cervical scrapes“ (QIASure Zervikalabstriche) (aus Datei AP\_QIASure\_CervicalScrape\_V1\_0\_Y.iap) gilt für vom Arzt entnommene Zervixproben
  - QIASure Assay-Profil für selbst entnommene Bürstenproben (aus Datei AP\_QIASure\_SelfCollectedBrush\_V1\_0\_Y.iap) für selbst entnommene vaginale Bürstenproben. Diese Profile können von der Website des QIASure Methylation Test heruntergeladen werden. <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Das Assay-Profil muss in die Rotor-Gene AssayManager Software importiert werden.

Hinweis: Das QIASure-Kit kann nur ausgeführt werden, wenn die Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software entsprechend konfiguriert ist.

Um einen sicheren Betrieb des gesamten Systems zu gewährleisten, müssen die folgenden Einstellungen für den geschlossenen Modus (Closed Mode) vorgenommen werden:

- „Material number required“ (Materialnummer erforderlich)
- „Valid expiry date required“ (Gültiges Verfallsdatum erforderlich)
- „Lot number required“ (Chargennummer erforderlich)

## Installieren des Epsilon Plug-ins und Import des Assay-Profiles

Detaillierte Informationen zu Installation und Import von Epsilon Plug-in und Assay-Profil finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager Core Application Handbuch* und im *Epsilon Plug-in Handbuch*.

- Laden Sie sowohl das Epsilon Plug-in als auch die neueste Version des QIASure Assay Profile von der QIAGEN-Website herunter.
- Starten Sie die Installation, indem Sie auf die Datei *EpsilonPlugin.Installation.msi* doppelklicken, und befolgen Sie die Installationsanweisungen. Detaillierte Informationen hierzu finden Sie im Abschnitt „Installation von Plug-ins“ des *AssayManager Core Application Handbuchs*.

Hinweis: Um die Sicherheit für das gesamte System zu gewährleisten, wählen Sie die Registerkarte **Settings** (Einstellungen) aus und aktivieren für den geschlossenen Modus unter „Work list“ (Arbeitsliste) die Kontrollkästchen **Material number required** (Materialnummer erforderlich), **Valid expiry date required** (Gültiges Verfallsdatum erforderlich) und **Lot number required** (Chargennummer erforderlich). Wenn diese Optionen nicht aktiviert sind (kein Häkchen), klicken Sie darauf, um sie zu aktivieren.

- Nach der erfolgreichen Installation des Plug-ins muss eine Person mit Administratorrechten für die Rotor-Gene AssayManager Software das Assay-Profil *AP\_QIASure\_V1\_0\_Y.iap* wie folgt importieren:

1. Öffnen Sie die Rotor-Gene AssayManager Software durch Klicken auf das Symbol.

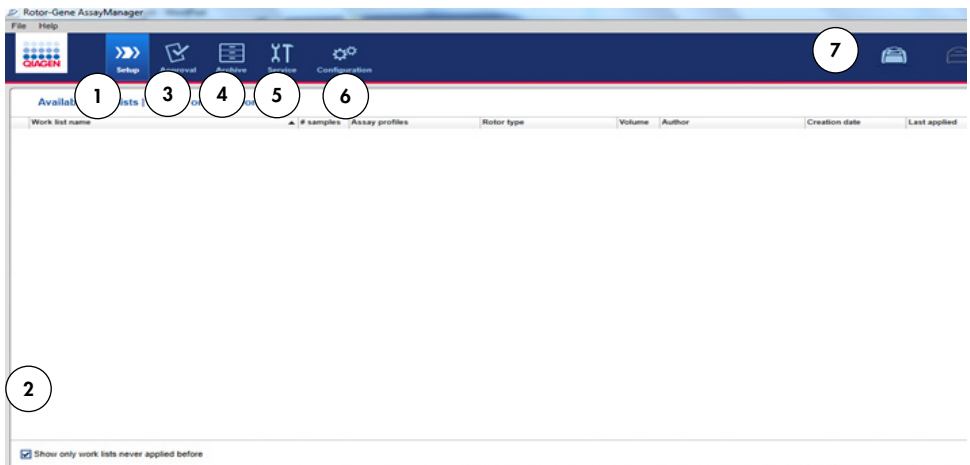


Das Rotor-Gene AssayManager-Fenster wird geöffnet (siehe Abbildung 1).



Abbildung 1. Anmeldebildschirm der Rotor-Gene AssayManager Software

2. Melden Sie sich mit Ihrer Benutzer-ID und Ihrem Kennwort bei der Rotor-Gene AssayManager Software an. Der Modus „Closed“ (Geschlossen) darf nicht geändert werden. Klicken Sie auf OK. Es erscheint der Bildschirm der Rotor-Gene Assay Manager Software (siehe unten).



- 1 Registerkarte Set-up (Einrichtung). Auf dieser Registerkarte können Sie Arbeitslisten verwalten oder anwenden.
- 2 Bei Aktivierung dieser Option werden nur neue Arbeitslisten angezeigt.
- 3 Registerkarte Approval (Genehmigung). Auf dieser Registerkarte können Sie nach vorherigen Analysen (Läufen) suchen.
- 4 Registerkarte Archive (Archiv). Auf dieser Registerkarte können Sie nach alten Analysen (Läufen) suchen, die bereits genehmigt wurden.
- 5 Registerkarte Service. Auf dieser Registerkarte wird der Audit-Trail-Bericht für jede von der Software generierte Datei angezeigt.
- 6 Registerkarte Configuration (Konfiguration). Ermöglicht die Konfiguration aller Softwareparameter.
- 7 Rotor-Gene Q MDx-Symbole.



Nicht verbunden



Verbunden

3. Wählen Sie die Umgebung „Configuration“ (Konfiguration) aus.
  4. Wählen Sie die Registerkarte Assay Profiles (Assay-Profil) aus.
  5. Klicken Sie auf Import (Importieren).
  6. Wählen Sie das Assay-Profil AP\_QIASure\_CervicalScrape\_V1\_0\_Y.iap für Zervixproben und/oder das Assay-Profil AP\_QIASure\_SelfCollectedBrush\_V1\_0\_Y.iap zum Importieren in das Dialogfeld aus und klicken Sie dann auf Open (Öffnen).
  7. Nach dem erfolgreichen Import des Assay-Profils kann es in der Umgebung „Setup“ (Einrichtung) verwendet werden.
- Hinweis: Es ist nicht möglich, die gleiche Version eines Assay-Profils erneut zu importieren.

## Probenverarbeitung auf Rotor-Gene Q MDx Thermocyclern mit 72-Röhrchen-Rotor

Neben einem Kalibrator und einer Nicht-Template-Kontrolle können bis zu 70 Bisulfite-konvertierte DNA-Proben in demselben Lauf (Analyse) getestet werden. Die schematische Abbildung in Tabelle 1 zeigt ein Beispiel der Ladeblock- oder Rotoreinrichtung für einen Lauf mit dem QIASure Methylation Test. Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an.



Tabelle 1. Platten- und Rotoreinrichtung für einen Lauf mit dem QIASure-Kit auf dem Rotor-Gene Q MDx Thermocycler

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

**VORSICHT**

Die Röhrchen müssen wie in Tabelle 1 angegeben in den Rotor eingesetzt werden. Die im Assay-Profil festgelegte automatisierte Analyse beruht auf diesem Layout. Wenn eine andere Anordnung verwendet wird, werden falsche Ergebnisse erhalten.

Hinweis: Besetzen Sie alle freien Positionen mit leeren Röhrchen.

## PCR auf Rotor-Gene Q MDx-Thermocyclern mit 72-Röhrchen-Rotor

Vor dem ersten Lauf des Tages muss der Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM bei 95  C 10 Minuten lang aufgewärmt werden.

1. Erstellen Sie wie im Folgenden beschrieben eine Arbeitsliste für die zu verarbeitende Probe:

- 1a. Schalten Sie den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler ein.
- 1b. Öffnen Sie die Rotor- Gene AssayManager Software und melden Sie sich als Benutzer in der Bedienerrolle im geschlossenen Modus an.
- 1c. Klicken Sie im Arbeitslisten-Manager in der Umgebung „Setup“ (Einrichtung) auf New work list (Neue Arbeitsliste).
- 1d. Wählen Sie in der Liste der verfügbaren Assay-Profile das QIASure assay profile (QIASure-Assay-Profil) aus.

Hinweis: Das Assay-Profil AP\_QIASure\_CervicalScrape\_V1\_0\_Y.iap ist für Zervixproben und das Assay-Profil AP\_QIASure\_SelfCollectedBrush\_V1\_0\_Y.iap für selbst entnommene vaginale Bürstenproben vorgesehen.

Hinweis: Pro Analyse kann nur ein Probenotyp getestet werden.

- 1e. Klicken Sie auf Move (Verschieben), um das ausgewählte Assay-Profil in die Liste Selected assay profiles (Ausgewählte Assay-Profile) zu verschieben. Das Assay-Profil sollte nun in der Liste „Selected assay profiles“ (Ausgewählte Assay-Profile) angezeigt werden.
- 1f. Geben Sie in das entsprechende Feld die Anzahl der Proben ein.
- 1g. Geben Sie die folgenden Informationen zum QIASure-Kit ein, die auf dem Deckel der Packung angegeben sind.

- Materialnummer: 1102417
- Gültiges Verfallsdatum mit dem Format JJJJ-MM-TT
- Chargennummer

- 1h. Wählen Sie den Schritt Samples (Proben) aus. Auf dem AssayManager-Bildschirm wird eine Liste mit den Probendetails angezeigt. In dieser Liste wird die erwartete Rotoranordnung angezeigt.
- 1i. Geben Sie für jede Probe die Proben-IDs sowie ggf. optionale Probeninformationen als Kommentar in diese Liste ein.
- 1j. Wählen Sie den Schritt Properties (Eigenschaften) aus und geben Sie einen Arbeitslistenamen ein (Abbildung 2).

Abbildung 2. Eigenschaften

- 1k. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen is applicable (ist anwendbar) und klicken Sie auf Apply (Anwenden).
- 1l. Speichern Sie die Arbeitsliste.  
Die Arbeitsliste kann gedruckt werden, was für die Vorbereitung und Einrichtung der PCR hilfreich ist. Klicken Sie auf Print work list (Arbeitsliste drucken), um die Arbeitsliste zu drucken. Die Probendetails werden in diese Arbeitsliste eingefügt.  
Hinweis: Sie können die Arbeitsliste erstellen, nachdem der Lauf im Instrument vorbereitet wurde oder Sie können die Arbeitsliste speichern, bevor die Proben ins Instrument gesetzt werden.

## 2. Bereiten Sie den QIASure-Lauf vor.

Um das Kontaminationsrisiko der PCR-Reaktion möglichst gering zu halten, sollte unbedingt eine PCR-Werkbank mit UV-Bestrahlungsfunktion verwendet werden.

Der QIASure Master Mix muss in einem Bereich dispensiert werden, der von dem Bereich getrennt ist, in dem die Bisulfit-Konvertierungsreaktion der DNA durchgeführt wird.

Reinigen Sie den Arbeitsbereich, die Pipetten und das Röhrchenrack vor dem Gebrauch mit einer DNA-zersetzenden Lösung, um eine Template- oder Nukleasekontamination zu verhindern.

Hinweis: Wechseln Sie nach jedem Röhrchen die Spitzen, um unspezifische Templates oder eine Kontamination des Reaktionsgemisches zu verhindern, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

2a. Tauen Sie den QIASure Master Mix und den QIASure Calibrator vollständig auf und schützen Sie den QIASure Master Mix möglichst vor Licht.

Hinweis: Begrenzen Sie die Auftauzeit auf 30 Minuten, um eine Zersetzung des Materials zu verhindern.

2b. Mischen Sie vorsichtig durch 10-maliges Umschwenken und zentrifugieren Sie kurz vor dem Gebrauch.

2c. Geben Sie 17,5 µl des gebrauchsfertigen QIASure Master Mix in die entsprechenden Röhrchenstreifen. Die Reaktionseinrichtung muss bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

2d. Stellen Sie den QIASure Master Mix wieder in den Gefrierschrank, um eine Zersetzung des Materials zu verhindern.

2e. Überführen Sie die Röhrchen zu einem getrennten Bereich, um die Assay-Kontrollen und die Bisulfit-konvertierten Proben zuzugeben.

2f. Geben Sie 2,5 µl Wasser zur Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) in Position 2 zu (siehe Tabelle 1 oben). Mischen Sie den Inhalt vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren.

2g. Geben Sie 2,5 µl QIASure Calibrator in Position 1 (siehe Tabelle 1 oben). Mischen Sie den Inhalt vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Verschluss.

2h. Geben Sie 2,5 µl Bisulfit-konvertierte DNA in das entsprechende Röhrchen. Mischen Sie den Inhalt vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren.

2i. Nachdem 4 Röhrchen gefüllt wurden, verschließen Sie diese.

Hinweis: Die PCR-Röhrchen können zwischen dem Pipettieren der Proben in die PCR-Röhrchen und dem Beginn der Analyse im Instrument 30 Minuten lang bei 2-8 °C dunkel gelagert werden.

2j. Stellen Sie den QIASure Calibrator wieder in den Gefrierschrank, um eine Zersetzung des Materials zu verhindern.

Hinweis: Wechseln Sie nach jedem Röhrchen die Spitzen, um unspezifische Templates oder eine Kontamination des Reaktionsgemisches zu verhindern, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

3. Bereiten Sie den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler vor und starten Sie den Lauf (Experiment) wie folgt:

3a. Setzen Sie einen 72-Well-Rotor in den Rotorhalter ein.

3b. Füllen Sie den Rotor mit Röhrchenstreifen in den zugewiesenen Positionen.

Beginnen Sie dabei wie in Tabelle 1 dargestellt an Position 1 und stellen Sie leere verschlossene Röhrchenstreifen in alle unbesetzte Positionen.

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass das erste Röhrchen an Position 1 und die Röhrchenstreifen in der korrekten Ausrichtung und den korrekten Positionen platziert werden, wie in Tabelle 1 dargestellt.

3c. Bringen Sie den Schließring an.

3d. Laden Sie den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler mit Rotor und Schließring und schließen Sie den Gerätedeckel.

3e. Wählen Sie in der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software die entsprechende Arbeitsliste im Arbeitslisten-Manager aus und klicken Sie auf Apply (Anwenden).

Bei noch geöffneter Arbeitsliste klicken Sie direkt auf Apply (Anwenden).

Hinweis: Wenn die Arbeitsliste für den Lauf noch nicht erstellt wurde, melden Sie sich bei der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software an und befolgen die Anweisungen in Schritt 1, bevor Sie fortfahren.

3f. Geben Sie den Namen des Laufs (der Analyse) ein.

- 3g. Wählen Sie aus der Liste Cyclers Selection (Thermocycler-Auswahl) den Cycler aus, der verwendet werden soll.
- 3h. Stellen Sie sicher, dass der Schließring richtig befestigt ist und bestätigen Sie dies auf dem Bildschirm.
- 3i. Klicken Sie auf Start experiment (Analyse starten).  
Der Lauf des QIASure Methylation Test sollte gestartet werden.
4. Klicken Sie auf Finish run (Lauf beenden), wenn der Lauf abgeschlossen ist.
5. Geben Sie den Lauf frei und genehmigen Sie ihn.
  - Wenn Sie sich mit der Rolle „Approver“ (Genehmiger) angemeldet haben, klicken Sie auf Release and go to approval (Freigeben und mit der Genehmigung fortfahren).
  - Wenn Sie sich mit der Rolle „Operator“ (Bediener) angemeldet haben, klicken Sie auf Release (Freigeben).
6. Geben Sie die Ergebnisse frei.
  - Nach dem Klicken auf Release and go to approval (Freigeben und mit der Genehmigung fortfahren) werden die Ergebnisse der Analyse angezeigt.
  - Wenn ein Benutzer mit der Rolle „User“ (Benutzer) auf Release (Freigeben) geklickt hat, muss sich jemand mit der Rolle „Approver“ (Genehmiger) anmelden und die Umgebung „Approval“ (Genehmigung) auswählen.
  - Suchen Sie nach dem Assay, der genehmigt werden soll, indem Sie die Filteroptionen auswählen und auf Apply (Anwenden) klicken.
  - Überprüfen Sie die Ergebnisse und genehmigen Sie die Ergebnisse für jede Testprobe.

Suchen Sie in der Tabelle „Results“ (Ergebnisse) nach der Probe, die genehmigt werden soll. Jedes zu genehmigende Probenergebnis hat drei Auswahlfelder am zugehörigen Zeilenende.

Nehmen Sie das Ergebnis einer Probe entweder an (Accept) oder lehnen Sie es ab (Reject).

Hinweis: Ein Ergebnis, das von der Rotor-Gene AssayManager Software automatisch auf INVALID (Ungültig) eingestellt wird, kann nicht mehr in ein gültiges Ergebnis umgewandelt werden, selbst wenn das Ergebnis abgelehnt wird.

Optional: Geben Sie eine Anmerkung in die Spalte „Sample comment“ (Anmerkung zur Probe) ein.

- Klicken Sie auf Release/Report data (Daten freigeben/berichten).
- Klicken Sie auf OK. Der Bericht wird im .pdf-Format (Adobe Portable Document) erstellt und automatisch im vordefinierten Ordner gespeichert. Der Pfad dieses Ordners lautet standardmäßig: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports** (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Berichte)

Hinweis: Dieser Pfad und Ordner können in der Umgebung „Configuration“ (Konfiguration) geändert werden.

- Gehen Sie zur Registerkarte Archive (Archiv), um die .rex-Datei mit den Rohdaten zu exportieren. Lokalisieren Sie mit den Filteroptionen die Analyse und klicken Sie auf Show assays (Assays anzeigen). Klicken Sie dann auf Export .rex file (.rex-Datei exportieren) und speichern Sie durch Klicken auf OK. Die Software speichert die .rex-Datei automatisch im vordefinierten Ordner: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments**

Hinweis: Dieser Pfad und Ordner kann auf der Registerkarte Specify the .rex file export destination (Exportspeicherort der .rex-Datei angeben) geändert werden.

Hinweis: Zur Fehlerbehebung wird ein Support-Paket des Laufs benötigt. Support-Containerdateien können in den Umgebungen „Approval“ (Genehmigung) oder „Archive“ (Archiv) erstellt werden. Weitere Informationen zur Fehlerbehebung finden Sie unter „Erstellen einer Support-Containerdatei“ im *Rotor-Gene AssayManager Core Application Handbuch*: <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/Rotor-Gene-assaymanager#resources>. Darüber hinaus kann das Audit-Trail vom Zeitpunkt des Vorfalls ( $\pm 1$  Tag) nützlich sein. Das Audit-Trail kann in der Umgebung „Service“ erstellt werden (*Rotor-Gene AssayManager Core Application Handbuch*).

7. Entladen Sie den Rotor-Gene Q MDx Thermocycler und entsorgen Sie die Röhrchenstreifen gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen.

# Interpretation der Ergebnisse

Die Analyse ist vollständig automatisiert.

Der Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysiert zuerst die Amplifikationskurven, wobei nicht konforme Kurven je nach Form und Rauschamplitude u. U. als ungültig eingestuft werden. Die entsprechende als ungültig eingestufte Kurve wird in diesem Fall mit einer Markierung gekennzeichnet (siehe Tabelle 2).

Die Laufkontrollen werden dann von der Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysiert:

- Kalibrator
- NTC

Hinweis: In dem bei Abschluss des Laufs erstellten Bericht werden die Ergebnisse der Testlaufkontrollen angegeben. Ungültige Daten sind darin mit einer entsprechenden Markierung gekennzeichnet.

Wenn alle Kontrollen des Laufs die Spezifikationen erfüllen, analysiert der Rotor-Gene AssayManager die unbekannten Proben.

Die Markierungen für ungültige Proben, die den einzelnen Röhrchen bei der Analyse von der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software zugewiesen werden können, sind mit einer Erklärung in Tabelle 2 zusammengefasst.



Tabelle 2. Probenmarkierungen für ungültige Proben und Beschreibung der Begriffe

Markierung	Verhalten	Beschreibung
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ungültig)	Der Zielwert liegt über dem festgelegten Bereich. Dabei kann es sich um einen $C_T$ -Wert, eine Endpunkt-Fluoreszenz, eine Konzentration oder einen berechneten Wert handeln, z. B. den mittleren $C_T$ -Wert oder $\Delta C_T$ -Wert.
ASSAY_INVALID (ANALYSE_UNGÜLTIG)	Invalid (Ungültig)	Der Assay ist ungültig, weil mindestens eine externe Kontrolle ungültig ist.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Ungültig)	Der Zielwert liegt unter dem festgelegten Bereich. Dabei kann es sich um einen $C_T$ -Wert, eine Endpunkt-Fluoreszenz, eine Konzentration oder einen berechneten Wert handeln, z. B. den mittleren $C_T$ -Wert oder $\Delta C_T$ -Wert.
CONSECUTIVE_FAULT (KONSEKUTIVER_FEHLER)	Invalid (Ungültig)	Das Ziel, das zur Berechnung dieses Ziels verwendet wurde, ist ungültig.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (ANOMALE_KURVENFORM)	Invalid (Ungültig)	Die Rohdaten-Amplifikationskurve weist eine Form auf, die vom bekannten Verhalten für diesen Assay abweicht. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für falsche Ergebnisse oder eine Fehlinterpretation der Ergebnisse.
FLAT_BUMP (FLACHE_BEULE)	Invalid (Ungültig)	Die Rohdaten-Amplifikationskurve weist eine flache Beulenform auf, die vom festgelegten Verhalten für diesen Assay abweicht. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für falsche Ergebnisse oder eine Fehlinterpretation der Ergebnisse (z. B. fehlerhafte Bestimmung des $C_T$ -Werts).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Gültig)	Die Nicht-Template-Kontrolle ergab für das Ziel ACTB Signale mit $C_T$ -Werten über 36.
INVALID_CALCULATION (UNGÜLTIGE BERECHNUNG)	Invalid (Ungültig)	Die Berechnung für dieses Ziel ist fehlgeschlagen.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (MEHRFACHE_ÜBERSCHREITUNG_SCHWELLENW ERT)	Invalid (Ungültig)	Die Amplifikationskurve kreuzt den Schwellenwert mehr als einmal. Ein eindeutiger $C_T$ -Wert kann nicht bestimmt werden.
NO_BASELINE (KEINE_BASISLINIE)	Invalid (Ungültig)	Für die Anfangsbasislinie wurde kein Anfangswert gefunden.
NO_CT_DETECTED	Variable	Es wurde kein $C_T$ für dieses Ziel detektiert.

NO_VALUE	Invalid (Ungültig)	Es gibt entgegen der Erwartung keinen Wert für dieses Ziel. Dieser Wert muss nicht in einem bestimmten Bereich liegen. Dabei kann es sich um einen C <sub>T</sub> -Wert, eine Endpunkt-Fluoreszenz, eine Konzentration oder einen berechneten Wert handeln, z. B. den mittleren C <sub>T</sub> -Wert oder $\Delta C_T$ -Wert.
NORM_FACTOR_ALTERATION	Warnung	Abweichung beim Normalisierungsverfahren. Die Amplifikationskurve wird mit einer Standardnormalisierung angezeigt; die Ergebnisse sollten manuell überprüft werden.
OTHER_TARGET_INVALID (ANDERES_ZIEL_UNGÜLTIG)	Invalid (Ungültig)	Ein anderes Ziel für die gleiche Probe ist ungültig.
SATURATION (SÄTTIGUNG)	Invalid (Ungültig)	Die Rohdaten-Fluoreszenz weist vor dem Wendepunkt der Amplifikationskurve eine deutliche Sättigung auf.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warnung	Die Rohdaten-Fluoreszenz erreicht in der Plateauphase der Amplifikationskurve einen Sättigungszustand.
SPITZE	Warnung	Eine Spitze in der Rohdaten-Fluoreszenz wird in der Amplifikationskurve detektiert, jedoch außerhalb der Region, für die der C <sub>T</sub> -Wert bestimmt wird.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (SPITZE_NAHE_CT)	Invalid (Ungültig)	In der Amplifikationskurve wurde eine Spitze nahe des C <sub>T</sub> erkannt.
STEEP_BASELINE (STEILE_BASISLINIE)	Invalid (Ungültig)	In der Amplifikationskurve wurde eine steil ansteigende Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz erkannt.
STRONG_BASELINE_DIP (STARKER_ABFALL_BASISLINIE)	Invalid (Ungültig)	Die Amplifikationskurve weist einen deutlichen Abfall der Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz auf.
STRONG_NOISE (STARKES_RAUSCHEN)	Invalid (Ungültig)	Außerhalb der Wachstumsphase der Amplifikationskurve wurde starkes Rauschen erkannt.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (STARKES_RAUSCHEN_IN_WACHSTUMSPHASE)	Invalid (Ungültig)	In der (exponentiellen) Wachstumsphase der Amplifikationskurve wurde starkes Rauschen erkannt.
UNCERTAIN	Variable	Ergebnisse des AUDAS stehen im Widerspruch zu Ergebnissen der Kernausswertung. Eine eindeutige automatische Bewertung der Datengültigkeit ist nicht möglich.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable	Es wird ein C <sub>T</sub> -Wert für ein Ziel detektiert, das nicht amplifiziert werden sollte.

UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Ungültig)	Das Ziel hat einen Wert, es ist jedoch kein erwarteter Wert. Dabei kann es sich um einen C <sub>T</sub> -Wert, eine Endpunkt-Fluoreszenz, eine Konzentration oder einen berechneten Wert handeln, z. B. den mittleren C <sub>T</sub> -Wert oder ΔC <sub>T</sub> -Wert.
UPSTREAM	Variable	Der Probenstatus wurde in einem vorgelagerten Prozess (z. B. QIAsymphony) auf Invalid (Ungültig) oder Unclear (Unklar) eingestellt.  Hinweis: Das Verhalten der Rotor-Gene AssayManager Software bei der Verarbeitung von Proben, die als „Unclear“ (Unklar) markiert wurden, wird in der Umgebung „Configuration“ (Konfiguration) der Software festgelegt. Die Markierung „Invalid“ (Ungültig) von vorgelagerten Prozessen führt immer zu einer entsprechenden ungültigen Probe in der Rotor-Gene AssayManager Software.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (WELLENFÖRMIGE_FLUORESCENZ_BASISLINIE)	Invalid (Ungültig)	Die Amplifikationskurve weist eine wellenförmige Basislinie für die Rohdaten-Fluoreszenz auf.

- Wenn alle Kontrollen des Laufs gültig sind, analysiert die Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software die unbekannten Proben. Damit die Ergebnisse interpretiert werden, muss die Probe eine Mindestmenge an Bisulfit-konvertierter DNA enthalten. Als Richtwert hierfür gilt der C<sub>T</sub>-Wert des Haushaltsgens ACTB, der ≤ 26,4 sein muss, damit eine Probe von der Rotor-Gene AssayManager Software als gültig eingestuft wird.
- Die ΔΔC<sub>T</sub>-Werte für *FAM19A4* und *hsa-mir124-2* werden dann berechnet und das Ergebnis wird angegeben. Wenn ein ΔΔC<sub>T</sub>-Wert unterhalb des Cut-off-Werts liegt, wird das Ziel als „Hypermethylation positive“ (Hypermethylierungs-positiv) eingestuft.  
Hinweis: Eine partielle oder unzureichende Methylierung ist ein natürlich vorkommendes Phänomen, das im Gegensatz zur Hypermethylierung nicht direkt mit der Entstehung von Krebs in Verbindung steht.
- Eine Probe wird als „Hypermethylation positive“ (Hypermethylierungs-positiv) betrachtet, wenn mindestens eines der Ziele als „Hypermethylation positive“ eingestuft wird.
- Proben mit einer niedrigen DNA-Qualität/-Quantität (d. h. C<sub>T</sub>-Werte von ACTB erfüllen gerade eben das Akzeptanzkriterium; C<sub>T</sub>-Werte von 25 bis 26,4) könnten als falsch

negative Proben eingestuft werden. Wiederholung der PCR-Testung in Einzelbestimmung wird empfohlen. Ein negatives Ergebnis bei der Testwiederholung bedeutet, dass die Probe Hypermethylierungs-negativ ist; ein positives Ergebnis steht dagegen für eine Hypermethylierungs-positive Probe.

- Bei Proben mit hoher Zellzahl, die mit einem direkten Konversionsprotokoll bearbeitet werden, besteht die Gefahr, dass die PCR-Reaktion mit DNA überladen wird, was zu einem falsch negativen Ergebnis für das Ziel FAM19A4 führen kann. Daher wird für Proben mit 1) einem negativen Hypermethylierungsergebnis, 2) einem ACTB C<sub>T</sub>-Wert  $\leq 23$  und 3) einem FAM19A4  $\Delta\Delta C_T$ -Wert zwischen 10,36 und 11,36 empfohlen, die PCR mit der fünffachen Menge an konvertierter DNA zu wiederholen, indem die Probe in Wasser verdünnt wird.

# Hilfe zur Fehlerbehebung

In dem vorliegenden Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“ finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ unseres TechniksUPPORT-Zentrums unter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Darüber hinaus steht Ihnen der Technische Service von QIAGEN unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch haben sollten oder zu Proben und Assay-Technologien (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Detaillierte Informationen zur Fehlerbehebung bei der Rotor-Gene AssayManager Software finden Sie im *Rotor-Gene AssayManager Core Application Handbuch*.

## Kommentare und Vorschläge

Allgemeine Handhabung	
DNA-Konzentration der Probe zu niedrig für eine Bisulfit-Konvertierung	
DNA-Extrakt überprüfen	DNA-Extraktion mit mehr konzentrierter klinischer Probe wiederholen.
Probe als ungültig eingestuft: Die Amplifikation von ACTB ist zu niedrig oder abwesend.	
a) Pipettierfehler oder Reagenzien ausgelassen	Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. PCR-Lauf wiederholen.
b) DNA-Konzentrat überprüfen	Die DNA-Aufgabemenge für die Bisulfit-Konvertierung auf ein Maximum erhöhen. Die Bisulfit-Konvertierungsreaktion ist bei einer DNA-Einsatzmenge von 100 ng-2 µg optimal.
c) Für das Protokoll „Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixprobe“ die klinische Probe auf Zellularität überprüfen.	Die Bisulfit-Konvertierungsreaktion mit 10 % der Zervixprobe in PreservCyt-Entnahmemedium (d. h. 2 ml von 20 ml) wiederholen.
d) Bisulfit-konvertiertes Eluat überprüfen.	Bisulfit-Konvertierung ggf. mit einer höheren DNA-Aufgabemenge wiederholen.
Probe als ungültig eingestuft: Die Ziele FAM19A4 und/oder hsa-mir124-2 sind ungültig.	
Unzureichende Vermischung	Probe und Reaktionsgemisch durch Pipettierung mischen (ca. 10-mal pro Röhrchen). Probe wiederholen.

## Kommentare und Vorschläge

Positivkontrolle als ungültig eingestuft: Die Amplifikation ist für mindestens eines der Ziele zu schwach oder nicht vorhanden.

- |                                                                                       |                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Pipettierfehler oder Reagenzien ausgelassen                                        | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. PCR-Lauf wiederholen.                                                                                                                     |
| b) Partielle Zersetzung                                                               | Kit-Inhalt bei $-30$ bis $-15$ °C lagern.<br>Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden (maximal drei Zyklen).                                                                             |
| c) PCR-Reagenzien partiell zersetzt                                                   | Den Kit-Inhalt bei $-30$ bis $-15$ °C lagern und die Reaktionsgemische vor Licht schützen.<br>Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.                                                  |
| d) Inversion des Röhrchenstreifens                                                    | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen.                                                                                                                                           |
| e) Verfallsdatum                                                                      | Verfallsdatum des verwendeten Kits überprüfen.                                                                                                                                                 |
| f) Zeitliche Verzögerung zwischen der Pipettierung der Proben und dem Start des Laufs | Die PCR-Reaktionsgemische können zwischen der Dispensierung der Proben für die PCR-Reaktionen und dem Start des Laufs im Instrument 30 Minuten lang bei $2-8$ °C im Dunkeln aufbewahrt werden. |

Nicht-Template-Kontrolle (NTC) ist ungültig

- |                                                                                       |                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Pipettierfehler                                                                    | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. PCR-Lauf wiederholen.                                                                                                                                 |
| b) Kreuzkontaminationen                                                               | Alle kritischen Reagenzien auswechseln.<br>Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsmaterialien stets gemäß den allgemein akzeptierten Verfahren handhaben, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden. |
| c) Reagenzkontamination                                                               | Alle kritischen Reagenzien auswechseln.<br>Proben, Kit-Komponenten und Verbrauchsmaterialien stets gemäß den allgemein akzeptierten Verfahren handhaben, um eine Verschleppungskontamination zu vermeiden. |
| d) Inversion des Röhrchenstreifens                                                    | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen.                                                                                                                                                       |
| e) Zeitliche Verzögerung zwischen der Pipettierung der Proben und dem Start des Laufs | Die PCR-Reaktionsgemische können zwischen der Dispensierung der Proben für die PCR-Reaktionen und dem Start des Laufs im Instrument 30 Minuten lang bei $2-8$ °C im Dunkeln aufbewahrt werden.             |
| f) Sondenzerersetzung                                                                 | Reaktionsgemische vor Lichteinwirkung schützen.<br>Fluoreszenzkurve auf falsch positive Ergebnisse überprüfen.                                                                                             |

Schwache oder keine Signale in der Probe, Kontrolllauf jedoch OK

- |                    |                                                                                                                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Hemmwirkung     | Stets sicherstellen, dass bei der Bisulfit-Konvertierung nach der Zentrifugation kein Puffer im Filter verbleibt.<br>Bisulfit-Konvertierung wiederholen. |
| b) Pipettierfehler | Pipettierschema und Reaktionseinrichtung überprüfen. PCR-Lauf wiederholen.                                                                               |

Wenn das Problem bestehen bleibt, den technischen Service von QIAGEN verständigen.

# Grenzen

Die Reagenzien des QIASure Methylation Test sind ausschließlich für die in-vitro-diagnostische Anwendung vorgesehen.

Die Durchführung von PCR-Tests setzt eine gute Laborpraxis voraus. Dazu gehört die Wartung der Ausrüstung, die ausschließlich für molekularbiologische Anwendungen zu verwenden ist und den Anforderungen aller geltenden Vorschriften und relevanten Standards gerecht wird.

Die Reagenzien und Anweisungen in diesem Kit wurden für optimale Leistung validiert.

Der QIASure Methylation Test darf nur von Laborfachkräften verwendet werden, die im Gebrauch der Rotor-Gene Q MDx Thermocycler und der Rotor-Gene AssayManager v1.0 Software geschult sind.

Das Produkt ist ausschließlich im Rahmen in-vitro-diagnostischer Verfahren für den Gebrauch durch Personal vorgesehen, das in den Methoden der Real-Time PCR geschult ist. Die erhaltenen diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung anderer vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.

Zur Gewährleistung optimaler PCR-Ergebnisse müssen die Anweisungen im Benutzerhandbuch genau befolgt werden.

Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Komponenten mit abgelaufenem Verfallsdatum dürfen nicht verwendet werden.

Proben mit einer niedrigen DNA-Qualität/-Quantität (d. h.  $C_T$ -Werte von ACTB erfüllen gerade eben das Akzeptanzkriterium;  $C_T$ -Werte von 25 bis 26,4) könnten als falsch negative Proben eingestuft werden. Wiederholung des Tests in Einzelbestimmung wird empfohlen. Ein negatives Ergebnis bei der Testwiederholung bedeutet, dass die Probe Hypermethylierungs-negativ ist; ein positives Ergebnis steht dagegen für eine Hypermethylierungs-positive Probe.

Alle im QIASure Methylation Test enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus demselben Kit vorgesehen. Ein Verstoß hiergegen kann die Leistung beeinträchtigen.

Der QIASure Methylation Test ist für HPV-positive Frauen validiert.

Der QIASure Methylation Test ist validiert für Zervixproben, die entnommen und in PreservCyt, SurePath™ oder STM-Medien gelagert wurden, sowie für selbst entnommene vaginale Bürstenproben, die bei Ankunft im Labor in PreservCyt gelagert wurden.

Für den Gebrauch mit dem QIASure Methylation Test PCR-Assay wurde ausschließlich der Rotor-Gene Q MDx Thermocycler validiert.

Eine Verwendung dieses Produkts für einen anderen als den vorgesehenen Zweck oder eine Modifikation der Komponenten führt zum Erlöschen der Haftung von Self-screen B.V.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die Leistungsstudien von Self-screen abgedeckt ist, die Leistungscharakteristik des Systems selbst zu validieren.



# Leistungsmerkmale

## Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD)

Die analytische Sensitivität des QIASure Methylation Test wurde anhand einer Verdünnungsreihe von Plasmiden mit allen drei Amplifikatsequenzen (d. h. *ACTB*, *FAM19A4* und *hsa-mir124-2*; über den Bereich von 750.000 bis 0,25 Kopien pro PCR) als 95 % der Nachweisgrenze (95 % LOD) bestimmt. Dabei wurde für 95 % LOD der Ziele die niedrigste Plasmidverdünnung verwendet, für die aus 36 Ergebnissen mindestens 35 positive Ergebnisse erhalten werden ( $C_T < 40$ ). Es wurden insgesamt 12 Analysen von vier verschiedenen Bedienern (1 Lauf pro Bediener pro Tag) unter Verwendung von drei verschiedenen Chargen und drei verschiedenen RGQ-Instrumenten durchgeführt. Jede Analyse umfasste dabei die Dreifachbestimmung von 11 Plasmidverdünnungen. 95 % LOD betrug für alle drei Ziele 7,5 Kopien pro PCR.

## Linearität

Die Linearität des QIASure-Assays wurde anhand der Daten aus 12 Analysen bestimmt, die zur Bestimmung von 95 % LOD durchgeführt wurden. Die beiden Ziele *FAM19A4* und *hsa-mir124-2* sowie die Referenz *ACTB* haben einen linearen Amplifikationsbereich von 750.000 bis 7,5 Kopien pro PCR.

## Präzision

Die Präzision des QIASure Methylation Test wurde als die Intra-Assay-Variabilität (Variabilität mehrerer Ergebnisse, die in einer Analyse für Proben der gleichen Konzentration erhalten wurden) und die Gesamtvarianz (Variabilität mehrerer Ergebnisse, die von verschiedenen Bedienern auf unterschiedlichen Instrumenten für verschiedene Chargen in verschiedenen Labors für den Assay erhalten wurden) des Assays bestimmt. Die Tests wurden an Bisulfit-konvertierter DNA aus Hochrisiko-HPV-positiven Zervixproben durchgeführt, die anhand der

Signale sowohl für *FAM19A4* als auch für *hsa-mir124-2* als Hypermethylierungs-positiv getestet wurden. Als Kriterium galt dabei die 3-fache LOD. Die Tests wurden in Doppelbestimmungen in 8 Läufen von 4 verschiedenen Bedienern (ein Lauf pro Bediener pro Tag) und unter Verwendung von 2 verschiedenen Chargen und 3 verschiedenen RGQ-Instrumenten in 2 verschiedenen Labors durchgeführt. Dabei wurden pro Probe insgesamt 16 Datenpunkte erhalten. Für die  $C_T$ - und  $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurde der Variationskoeffizient (VK) bestimmt (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3. %VK der  $C_T$ - und  $\Delta\Delta C_T$ -Werte in einer methylierungspositiven Zervixprobe**

	Probenart	Probenart (%)	Probenart (%)
CT-Wert	Interne Probenqualitätskontrolle (d. h. ACTB)	0,3	1,32
	FAM19A4	1,02	1,52
	hsa-mir124-2	1,16	1,64
$\Delta\Delta C_T$ -Wert	FAM19A4	3,70	5,97
	hsa-mir124-2	4,21	5,75

Die statistische Streubreite der  $C_T$ -Werte einer Probe mit der genannten Konzentration beträgt für die interne Probenqualitätskontrolle (ACTB) insgesamt 1,32 %, für *FAM19A4* 1,52 % und für *hsa-mir124-2* 1,64 %. Die statistische Streubreite der  $\Delta\Delta C_T$ -Werte einer Probe mit der genannten Konzentration beträgt für *FAM19A4* insgesamt 5,97 % und für *hsa-mir124-2* 5,75 %.

## Störsubstanzen

Zur Untersuchung der potenziellen Störeffekte auf die PCR wurden der Desulfonierungspuffer und der Waschpuffer des Bisulfit-Konvertierungskits ausgewählt. Substanzen, die in den ursprünglichen Proben vorhanden sein können, wurden nicht getestet, da die Proben-DNA zweimal mit Silikabeads aufgereinigt wird: einmal bei der DNA-Extraktion von der ursprünglichen Probe und ein weiteres Mal bei der DNA-Aufreinigung nach der Bisulfit-Konvertierung. Spuren der Desulfonierungs- und Waschpuffer führten zu einer Störung der PCR, die durch ein ungültiges Testergebnis für die interne Probenqualitätskontrolle aufgedeckt wurde.

# Klinische Leistungsmerkmale

## HPV-positive Zervixproben \*

Die klinischen Leistungsmerkmale des QIAzure Methylation Test für zervikale intraepitheliale Neoplasien des Grades 3 (CIN 3) und Zervixkarzinome (d. h. CIN 3+) wurde in einer retrospektiven multizentrischen EU-Studie bewertet (13). Der QIAzure Methylation Test wurde an 2384 HPV-positiven Zervixproben aus Vorsorgeuntersuchungen bei Frauen (Alter 29-76 Jahre) aus vier EU-Ländern (Schottland, Slowenien, Dänemark, Niederlande) bewertet (13). Die Proben wurden in PreservCyt- oder SurePath-Medien entnommen. Die Studienpopulation umfasste 2012 Frauen ohne Krankheitsnachweis innerhalb von 2 Jahren nach der Untersuchung (abgekürzt als  $\leq$  CIN 1), 124 mit CIN 2, 228 mit CIN 3 und 20 mit Karzinom. DNA wurde aus den Zervixproben extrahiert und 250 ng DNA wurden für die Bisulfit-Konvertierungsreaktion eingesetzt (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Von den 250 ng der modifizierten DNA wurden 20 % für die PCR verwendet (entspricht 50 ng der ursprünglichen Ziel-DNA/PCR). Die Gesamtraten der Positivität der nach klinischem Endpunkt stratifizierten Positivitätsraten des QIAzure Methylation Test sind im Folgenden dargestellt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4. Positivitätsraten des QIAzure Methylation Test

Klinischer Endpunkt	Anteil	Positivitätsrate (95%-KI)
$\leq$ CIN 1	437/2012	21,7 % (20–23,6)
CIN 2	58/124	46,8 % (38,1–56,6)
CIN 3	176/228	77,2 % (71,3–82,2)
Zervixkarzinom	19/20	95,0 % (70,7-99,3)

Unter den Hochrisiko-HPV-positiven Zervixproben beträgt die Sensitivität für CIN 3+ 78,6 % (195/248; 95%-KI: 73,1–88,3) und die Gesamtspezifität des QIAzure Methylation Test betrug 78,3 % (n = 2013; 95%-KI: 76–80). Der negative Vorhersagewert hrHPV-positiver, methylierungsnegativer Ergebnisse betrug 99,9 % für das Zervixkarzinom (N = 1694; 95%-KI: 99,6–99,99), 96,9 % für CIN3+ (95%-KI: 96–98), und 93,0 % für CIN2+ (95%-KI: 92–94).

\* Vom Arzt entnommene Zervixproben

Darüber hinaus wurde die Sensitivität für das Zervixkarzinom in einer multizentrischen weltweiten retrospektiven Studie an 519 invasiven Karzinomen mit unterschiedlichen Histotypen aus über 25 Ländern bewertet (11). DNA wurde aus den Zervixproben extrahiert und 250 ng DNA wurden für die Bisulfit-Konvertierungsreaktion eingesetzt (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Von den 250 ng der modifizierten DNA wurden 20 % für die PCR verwendet (entspricht 50 ng der ursprünglichen Ziel-DNA/PCR). 510 der 519 Karzinome wurden mit dem QIASure Methylation Test positiv getestet, was einer Positivitätsrate von 98,3 % entspricht (95%-KI: 96,7–99,2), die nach Histotyp stratifizierten Positivitätsraten sind nachfolgender Tabelle Tabelle 5. Positivitätsraten des QIASure Methylation Test bei Zervixkarzinomproben aufgeführt.

**Tabelle 5. Positivitätsraten des QIASure Methylation Test bei Zervixkarzinomproben**

Klinischer Endpunkt	Anteil	Positivitätsrate (95%-KI)
Plattenepithelzellkarzinom	313/318	98,4 % (96,4-99,5)
Adenokarzinom	121/123	98,4 % (94,2-99,8)
Adenosquamöses Karzinom	42/42	100,0 % (91,6–100)
Histotypen seltener Malignome	30/32	93,8 % (79,2–99,2)
Maligner Histotyp nicht näher bezeichnet	4/4	100 % (39,8–100,0)

### HPV-positive selbst entnommene vaginale Bürstenproben

Die klinischen Leistungsmerkmale des QIASure Methylation Test für den Nachweis von zervikalen intraepithelialen Neoplasien des Grades 3 und Zervixkarzinomen (d. h. CIN 3+) in selbst entnommenen vaginalen Bürstenproben wurden durch Testen von 247 Hochrisiko-HPV-positiven vaginalen Proben bewertet. Für 14 Proben (5,7 %) waren die ACTB-C<sub>T</sub>-Werte > 26,4 und wurden in der Folge als ungültig eingestuft. Zu den Proben mit gültigen Testergebnissen gehörten 148 selbst entnommene Bürstenproben von Frauen mit ≤ CIN 1 nach 18 Monaten Nachkontrolle, 24 Proben von Frauen mit CIN 2, 50 Proben von Frauen mit CIN 3, 8 Proben von Frauen mit Plattenepithelzellkarzinom und 3 Proben von Frauen mit Adenokarzinom. DNA wurde aus den Vaginalproben extrahiert und 250 ng DNA wurden für

die Bisulfit-Konvertierungsreaktion eingesetzt (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). Von den 250 ng der Bisulfit-konvertierten DNA wurden 20 % für die PCR verwendet (entspricht 50 ng der ursprünglichen Ziel-DNA/PCR). Die nach klinischem Endpunkt stratifizierten Positivitätsraten des QIASure Methylation Test sind nachfolgend dargestellt (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6. Positivitätsraten des QIASure Methylation Test für selbst entnommene vaginale Bürstenproben**

Klinischer Endpunkt	Anteil	Positivitätsrate (95 %-KI)
≤ CIN 1	34/148	23,0 % (16,9-30,4)
CIN 2	7/24	29,2 % (14,6-49,8)
CIN 3	33/50	66,0 % (52,0-77,7)
Plattenepithelzellkarzinom	8/8	100,0 % (63,1-100,0)
Adenokarzinom	3/3	100,0 % (29,2-100,0)

Unter den Hochrisiko-HPV-positiven selbst entnommenen vaginalen Bürstenproben beträgt die Sensitivität für CIN 3+ 72,1 % (44/61; 95%-KI: 59,7–81,9) und für Karzinome 100 % (11/11; 95%-KI: 72–100).\*

### Leistungsfähigkeit von *FAM19A4* und *hsa-mir124-2* für den Nachweis fortgeschrittener transformierender CIN-Läsionen

Die Methylierungsanalyse von Wirtszellen-Promotoren ermöglicht den spezifischen Nachweis sogenannter „fortgeschrittener“ CIN-Läsionen, die sich durch ein krebsartiges Methylierungsprofil auszeichnen und mit einem hohen Risiko der kurzzeitigen Krebsprogression verbunden sind (7, 8). Die Leistungsmerkmale der Promotor-Hypermethylierungsanalyse für *FAM19A4* und *hsa-mir124-2* wurden durch das Testen von 29 Hochrisiko-HPV-positiven Proben von Frauen mit fortgeschrittener, transformierender CIN 2/3 und 19 Hochrisiko-HPV-positiven Proben von Frauen mit transformierender CIN 2/3 im Frühstadium bewertet. Methylierung ging insbesondere mit fortgeschrittenen Erkrankungen einher; alle fortgeschrittenen CIN-2/3-Läsionen (100 %; 29/29; 95%-KI: 88–100) wurden als Hypermethylierungs-positiv eingestuft. Im Vergleich dazu standen 47 % (9/19; 95%-KI: 27–69) der CIN-2/3-Läsionen im Frühstadium.

\* Hinweis: Die Hypermethylierung der Ziele in den Proben von Frauen mit fortgeschrittener CIN-Läsion und/oder Zervixkarzinom ist aufgrund der Probenvariabilität, z. B. aufgrund einer nicht fachgerechten Probenentnahme, u. U. nicht messbar.

# Robustheit

Zur Bewertung der Robustheit des QIASure Methylation Test wurde die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des QIASure Methylation Test und denen einer Version des Assays bestimmt, die ausschließlich für Forschungsanwendungen (RUO, Research Use Only) vorgesehen ist. Die Tests wurden an Bisulfit-konvertierter genomischer DNA aus 10 Hochrisiko-HPV-positiven Zervixproben durchgeführt, von denen 5 Proben zuvor in Bezug auf beide Marker als Hypermethylierungs-negativ und 5 Proben (in Bezug auf mindestens einen der beiden Marker) als methylierungs-positiv eingestuft wurden. Die Tests wurden in Doppelbestimmungen in 8 Läufen von 4 verschiedenen Bedienern (ein Lauf pro Bediener pro Tag) und unter Verwendung von 2 verschiedenen Chargen und 3 verschiedenen Rotor-Gene Q MDx Thermocyclern in 2 verschiedenen Laboren durchgeführt. Dabei wurden pro Probe insgesamt 16 Datenpunkte erhalten (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7. Übereinstimmung zwischen dem QIASure Methylation Test und der RUO-Version des Assays**

Probennummer	RUO-Ergebnis	Übereinstimmung Labor 1 vs. RUO	Übereinstimmung Labor 2 vs. 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)

Für 4 der zuvor als methylierungs-negativ eingestuften 5 Proben wurde in beiden Labors bei Verwendung des QIAzure Methylation Test eine Übereinstimmung von 100 % erhalten. Für Probe 3 wurde in beiden Labors eine Übereinstimmung von 62,5 % (5/8) erhalten. Die beobachtete Variation bezog sich auf *FAM19A4* mit Werten um den Assay-Cutoff. Die Gesamtübereinstimmung zwischen den methylierungs-negativen Proben betrug 92,5 % (37/40).

Alle 5 zuvor als methylierungs-positiv eingestuften Proben zeigten eine Übereinstimmung mit dem Referenzassay von 100 %; dies entspricht einer Gesamtübereinstimmung von 100 % (40/40).

### Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben

Das Protokoll „Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben mit dem EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit“ wurde durch Vergleich mit dem Referenzprotokoll (d. h. Bisulfit-Konvertierung mit vorangegangener Qualitätskontrolle der Proben-DNA) an 119 Zervikalabstrichen geprüft; anschließend wurde der QIAzure Methylation Test durchgeführt. Die Erfolgsrate der Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben bei Verwendung von 2,5 % Zervixprobenmaterial als Aufgabemenge betrug 95,8 % (114/119); bei Wiederholung des Tests für ungültige Proben mit 10 % Zervixprobenmaterial stieg sie auf 100 % an. Die Übereinstimmung der Ergebnisse des QIAzure Methylation Test für die beiden Protokolle zur Bisulfit-Konvertierung betrug 90,8 % (108/119; Kappawert 0,75).

Das Protokoll „Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben mit dem QIASymphony Bisulfite Kit“ wurde durch Vergleich mit dem Referenzprotokoll (d. h. Bisulfit-Konvertierung mit vorangegangener Qualitätskontrolle der Proben-DNA) an 120 Zervixabstrichen geprüft; anschließend wurde der QIAzure Methylation Test durchgeführt. Die Erfolgsrate der Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben bei Verwendung von 2,5 % Zervixprobenmaterial als Aufgabemenge betrug 94,2 % (113/120) versus 97,5 % (117/120) mit dem Referenzprotokoll. Die Übereinstimmung der Ergebnisse des QIAzure Methylation Test für die beiden Protokolle zur Bisulfit-Konvertierung betrug 94,7 % (107/113; Kappawert 0,88).

# Literatur















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<sup>-</sup>(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

# Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Verfallsdatum
	In-vitro-Diagnostikum
	CE-Zeichen für IVD-Produkte
	Inhalt ausreichend für <N> Reaktionen
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
Rn	R = Revision der Gebrauchsanweisung (Handbuch); n = Revisionsnummer
	Internationale Artikelnummer (Global Trade Item Number)
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Vor Lichteinwirkung schützen



Gebrauchsanweisung beachten



Vorsicht

## Kontakt

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem technischen Support-Center unter [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support). Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 0080022446000, oder wenden Sie sich an eine der Abteilungen des Technischen Service von QIAGEN oder an Ihre örtlichen Händler (siehe hintere Umschlagseite oder [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QIASure Methylation Test Kit	Für 72 Reaktionen: 2 Master-Mixe, 2 Kalibratoren.	616014
<b>QIAsymphony SP</b>	QIAsymphony Probenverarbeitungsmodul: 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit enthalten (optional für automatisierte Extraktion)	9001297
<b>Rotor-Gene Q MDx</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung.	9002032

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<b>Rotor-Gene Q MDx Zubehör</b>		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminium-Block zum manuellen Ansetzen der Reaktionen mit einer Einkanal-Pipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1.000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen	981106
<b>Rotor-Gene AssayManager – für Routinetests mit Rotor-Gene Q MDx Thermocyclern</b>		
Rotor-Gene AssayManager	Software für Routinetests in Verbindung mit Rotor-Gene Q und QIA Symphony RGQ Geräten; Software mit Einzellizenz für die Installation auf einem Computer	9022739

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

# Bearbeitungshistorie des Dokuments

Datum	Änderungen
R4, Juni 2019	Workflow-Flussdiagramm in „Verfahrensprinzip“ überarbeitet; in „Zusätzlich benötigtes Material“ das EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit hinzugefügt; Inhalt des Kästchens „Sicherheitshinweise“ überarbeitet; Informationen zum Aufwärmlauf für den RGQ MDx 5-plex HRM hinzugefügt; Abschnitt „Probenvorbereitung“ überarbeitet; Fehlerbehebung um zusätzlichen Punkt ergänzt; Leistungsmerkmale um die Bisulfit-Konvertierung direkt an Zervixproben ergänzt; Abschnitt „Literatur“ aktualisiert; Layout aktualisiert
R5, Juli 2023	QIAsymphony Geräte für die optionale Automatisierung der Extraktion und QIAsymphony Bisulfite Kit unter „Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material“ hinzugefügt; Abschnitt über die Probenvorbereitung überarbeitet; Verwendung des SurePath-Entnahmemediums hinzugefügt; Abschnitt über die klinischen Leistungsmerkmale überarbeitet. Überschriften für Tabelle 5 und Tabelle 6 hinzugefügt.

## Eingeschränkte Lizenzvereinbarung für den QIASure Methylation Test

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen Käufer oder Benutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

- Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, Kit-Komponenten zusammen mit anderen Komponenten, die nicht zu diesem Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen oder in zusätzlichen, unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
- Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
- Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
- QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
- Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

**Self-screen B.V. ist der Hersteller i. S. d. Gesetzes des QIASure Methylation Test.**

**Der QIASure Methylation Test wird von Self-screen B.V. hergestellt und von QIAGEN in Europa vertrieben.**

Marken: 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.). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

07-2023 HB-2304-005 1132288DE © 2023 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

