

Kesäkuu 2019

QIASure Methylation Test -käyttöohje



Versio 1

Käytettäväksi Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM -laitteen kanssa

IVD

In vitro -diagnostiikkaan

CE

REF

616014



Self-screen B.V., Biohof 15-1, 1098 RX Amsterdam, ALANKOMAAT

R4 **MAT**

1117742FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	4
Yhteenveto ja selitykset.....	5
Menetelmän toimintaperiaate.....	5
Toimitetut materiaalit.....	7
Sarjan sisältö	7
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	7
Varoitukset ja varotoimet.....	9
Turvallisuustiedot	9
Yleiset varotoimet	9
AssayManager-profiiliin liittyvät varotoimet	11
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	12
Näytteen käsittely ja säilytys.....	13
Näytteen valmistelu.....	14
Bisulfiittikonversion yleiset suositukset	16
Protokolla: QIASure Methylation Test -testin PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella	17
Tulosten tulkitseminen.....	29
Vianmääritys.....	33
Rajoitukset.....	36
Suorituskyky.....	38
Toteamisraja (LOD)	38
Linearisuus	38

Tarkkuus.....	38
Häiritsevät aineet	39
Kliininen suorituskyky	40
Robustisuus.....	42
Lähdeviitteet	45
Symbolit	46
Yhteystiedot	47
Tilautiedot	48
Asiakirjan muutoshistoria	51

Käyttötarkoitus

QIASure Methylation Test -testi on moninkertainen, metylaatio spesifinen real time PCR -analyysi geenien *FAM19A4* ja *hsa-mir124-2* promootorien hypermetylaation tunnistamiseksi. QIASure Methylation Test -testissä voidaan käyttää bisulfiittikonvertoitua DNA:ta, joka on peräisin seuraavanlaisista näytteistä:

- *digene*® HC2 DNA Collection Device -näytteenottolaitteella otetut kohdunkaulan irtosolunäytteet (lääkärin ottamat)
- Harjatyyppisellä näytteenottimella otetut kohdunkaulan irtosolunäytteet, jotka on kerätty PreservCyt® Solution -säilytysaineeseen (lääkärin ottamat)
- Harjatyyppisellä näytteenottimella otetut emättimen irtosolunäytteet (itse otetut)

Käyttöaiheet:

1. Jatkotutkimuksena naisille, joilla ihmisen papilloomaviruksen (human papillomavirus, HPV) testitulos on positiivinen, jotta voidaan määrittää kolposkopian tai muiden jatkotoimenpiteiden tarve.
2. Jatkotutkimuksena naisille, joiden papakokeen tuloksissa on merkitykseltään epäselviä epätyypillisiä levyepiteelisoluja (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), jotta voidaan määrittää kolposkopian tai muiden jatkotoimenpiteiden tarve.

Tuote on tarkoitettu teknikkojen, laboranttien ja muiden sellaisten ammattilaisten käyttöön, jotka ovat saaneet in vitro -diagnostisia (IVD) menetelmiä, molekyylibiologian tekniikoita ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -järjestelmää koskevaa koulutusta.

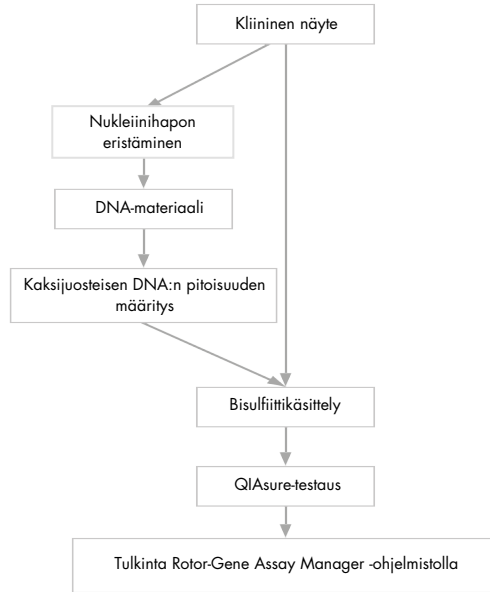
Yhteenveto ja selitykset

DNA:n metylaatio on biokemiallinen prosessi, joka on tärkeä kehittyneiden eliöiden normaalille kehitykselle (1). Metylaatioissa sytosiini-nukleotidin pyrimidiinirenkkaan 5. asemaan liittyy metyyliryhmä. DNA:n metylaation poikkeavuudet ovat merkittävä tekijä myös karsinogeneesissä. Useissa ihmisen syövässä ja syöpäsolumuotoissa, mukaan lukien kohdunkaulan syövässä ja kohdun limakalvon syövässä, on todettu geenien *FAM19A4* ja/tai *hsa-mir124-2* promoottorien hypermetylaatiota (2–6). Isäntäsolun promoottorien metylaatiotestillä voidaan tunnistaa syöpiä ja pitkälle edenneitä kohdunkaulan intraepiteliaalisia neoplasioita (CIN), joilla on syövän kaltainen metylaatioprofiili ja suuri riski kehittyä syöväksi lyhyellä aikavälillä (3, 7, 8, 10). QIASure-testillä voidaan todeta *FAM19A4*- ja *hsa-mir124-2*-geenien promoottorien hypermetylaatio bisulfiittikonvertoidusta DNA:sta, joka on peräisin kohdunkaulan tai emättimen irtosolunäytteistä, kun näytteen sisäisenä laatukontrollina käytetään ACTB:tä.

Menetelmän toimintaperiaate

QIASure Methylation Test -testi on moninkertainen real-time PCR -testi, jolla monistetaan kasvunrajoitegeenien *FAM19A4* ja *hsa-mir124-2* metyloituneita promoottorialueita sekä referenssigeenin metylaatioepäspesifiä fragmenttia. Sarja sisältää 2 putkea QIASure Master Mix -pääseosta ja 2 putkea QIASure Calibrator -kalibraattoria. Pääseos on tarkoitettu kliinisistä irtosolunäytteistä saadun bisulfiittikonvertoidun DNA:n monistamiseen. Pääseos sisältää alukkeet ja koettimet kohdegeeneille sekä referenssigeenille, joka toimii näytteen sisäisenä laatukontrollina. Kalibraattori on linearisoitu plasmidi, joka sisältää *FAM19A4:n*, *hsa-mir124-2:n* ja ACTB:n amplikonien sekvenssejä.

Työnkulku



QIASure-testi tehdään Rotor-Gene Q MDx -laitteella, ja Rotor-Gene AssayManager® -ohjelmisto analysoi ja tulkitsee testin tiedot automaattisesti. C_T -arvo (syklin kynnyсарvo) kertoo, kuinka monta PCR-sykliä tarvitaan fluoresoivan signaalin tunnistamiseen taustasignaalista. Kynnyсарvo korreloi näytteessä olevien kohdemolekyylien määrän kanssa. QIASure-testissä ΔC_T -arvo lasketaan *FAM19A4*- tai *hsa-mir124-2*-kohteiden C_T -arvon ja referenssin (ACTB) C_T -arvon erotuksena. ΔC_T on *FAM19A4*- tai *hsa-mir124-2*-geenin promoottorin metylaatiotason suhteellinen kvantitatiivinen arvo. Normalisointi tehdään vähentämällä kalibraattorinäytteen ΔC_T -arvo *FAM19A4*- tai *hsa-mir124-2*-kohteiden ΔC_T -arvosta, jolloin tulokseksi saadaan $\Delta\Delta C_T$ -arvo (9). Kalibraattori on standardoitu matalan kopiолuvun plasmidi-DNA-näyte, jonka kopiолuku tunnetaan kaikkien kolmen kohteen osalta (*FAM19A4*, *hsa-mir124-2* ja ACTB).

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

QIASure Methylation Test -testi		72
Tuotenumero		616014
Reaktioiden määrä		72
QIASure Master Mix -pääseos (2 putkea)	Ruskea	630 µl
QIASure Calibrator -kalibraattori (2 putkea)	Läpinäkyvä	25 µl
QIASure Methylation Test -käyttöohje		1

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvallisuustiedotteissa (Safety Data Sheets, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

Itse otettujen näytteiden käsittelyyn tarvittavat tarvikkeet ja reagenssit

- Hologic PreservCyt® Solution -liuos

Tarvikkeet ja reagenssit bisulfiittikonversioon

Verifioituja bisulfiittikonversiosarjoja ovat seuraavat:

- EZ DNA Methylation Kit -sarja (ZYMO Research, tuotenro D5001 tai D5002)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit -sarja (QIAGEN, tuotenro 59720)

Rotor-Gene Q MDx -laitteen tarvikkeet

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tuotenro 981103)
- Puhdistettua vettä (esim. molekyylibiologialaatu, tislattu tai deionisoitu)

Välineet

- Säädettäviä pipettejä* PCR-ajaja varten (1–10 µl; 10–100 µl)
- Kertakäyttökäsineitä
- Pöytämallinen sentrifugi*, nopeus > 10 000 rpm
- Vortex-sekoitin*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, tuotenro Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer -fluorospektrometri (Thermo Fisher Scientific, tuotenro ND-3300) tai vastaava*

Real-time PCR -välineet

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -järjestelmä (tuotenro 9002033) tai Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite (tuotenro 9002032)†
- Rotor-Gene AssayManager Core Application -ohjelmistoversio 1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in -lisäosa asennettuna, versio 1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 1)
- QIASure Assay Profile -testiprofiili (tiedostosta AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) (jossa Y on yhtä suuri tai suurempi kuin 1), jota käytetään lääkärin ottamista kohdunkaulan irtosolunäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han
- Itse otettujen emättimen harjanäytteiden QIASure-testiprofiili (tiedostosta AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) (jossa Y on yhtä suuri tai suurempi kuin 0), jota käytetään itse otetuista emättimen harjanäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han

* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

† Rotor-Gene Q 5plex HRM -laite, joka on valmistettu tammikuussa 2010 tai myöhemmin. Valmistuspäivämäärä käy ilmi laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Varoitukset ja varotoimet

Vain in vitro -diagnostiikkaan.

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheets, SDS). Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voi tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedotteita.

QIASURE MASTER MIX -PÄÄSEOS



Sisältää: 1,2,4-triatsoli: Varoitus! Epäillään heikentävän hedelmällisyyttä tai vaurioittavan sikiötä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

Yleiset varotoimet

PCR-testien käyttäminen edellyttää hyvien laboratoriotäytäntöjen noudattamista, joihin kuuluu molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden huolto sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Noudata aina seuraavia ohjeita:

- Käytä kertakäyttöisiä puuterittomia suojakäsineitä, laboratoriotakkia ja suojalaseja käsitellessäsi näytteitä.
- Estä näytteen ja tarvikesarjan mikrobi- ja nukleasi (DNAasi/RNAasi) -kontaminaatio. DNAasi saattaa hajottaa DNA-mallin.

- Vältä DNA:n tai PCR-tuotteen siirtymiskontaminaatiota, joka voi aiheuttaa väärää positiivista signaalia.
- Käytä aina kertakäyttöpipettejä, joissa ei ole DNAasia ja joissa on aerosolieste.
- QIASure-testin reagenssien laimennos on optimaalinen. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen.
- Kaikki QIASure -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä korvaa mitään reagenssia toisen QIASure-sarjan samalla reagenssilla (ei edes samasta erästä), sillä se voi vaikuttaa suorituskykyyn.
- Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöoppaassa on lisätietoja varoituksista, varotoimista ja menettelytavoista.
- Tee ennen päivän ensimmäistä ajoa Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajo (95 °C 10 minuutin ajan).
- Inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
- Älä käytä sellaisen tarvikesarjan komponentteja, jonka viimeinen käyttöpäivä on umpeutunut tai jota on säilytetty väärin.
- Vältä komponenttien altistumista valolle, koska reaktioseoksissa saattaa tällöin tapahtua muutoksia.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta seokset eivät sekoittuisi PCR-reagensseissa olevien synteettisten materiaalien kanssa.
- Hävitä näyte ja testijäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

AssayManager-profiiliin liittyvät varotoimet

Eri näytetyypeille tarvitaan eri AssayManager-profiilit. Varmista, että käytettävä profiili vastaa testattavan näytteen tyyppiä seuraavasti:

- Kohdunkaulan raaputusnäytteiden QIASure-testiprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) on käytettävä lääkärin ottamista kohdunkaulan irtosolunäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han
- Itse otettujen harjanäytteiden QIASure-testiprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) on käytettävä itse otetuista emättimen harjanäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kuljetusolosuhteet

QIASure Methylation Test -testi toimitetaan kuivajäissä. Jos jokin QIASure Methylation Test -testin komponentti ei ole vastaanottohetkellä jäissä, jos ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai jos toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen tukipalveluun tai paikalliseen jälleenmyyjään (katso lisätietoja takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytysolosuhteet

QIASure Methylation Test -testi on varastoitava heti vastaanottamisen jälkeen $-30...-15$ °C:n lämpötilassa olevaan pakastimeen, jonka lämpötila pysyy vakaana, ja pidettävä valolta suojattuna.

Stabiilius

Oikein säilytetty QIASure Methylation Test -testi on stabiili pakkauksen etiketissä ilmoitettuun vanhenemispäivään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan $-30...-15$ °C:n lämpötilassa. Toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastus- ja sulatusjaksoja saa olla enintään kolme.

- Sekoita kääntämällä putkea ylösalaisin 10 kertaa ja käytä kaikkia putkia sentrifugissa ennen avaamista.
- Reagenssien vanhenemispäivät on ilmoitettu kunkin komponentin etiketissä. Oikein säilytetyn tuotteen suoritustaso säilyy koko stabiilisuusajan, kunhan käytetään samoja komponenttieriä.

Näytteen käsittely ja säilytys



Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisena materiaalina.

Kohdunkaulan irtosolunäytteet

QIASure-sarja on tarkoitettu kohdunkaulan irtosolunäytteistä saadun bisulfiittikonvertoidun genomisen DNA:n analyysiin. Validoidut säilytysaineet kohdunkaulan irtosolunäytteille (raaputusnäytteet) ovat PreservCyt® -säilytysaine ja *Digene* Specimen Transport Medium (STM) -kuljetusaine. Kliinisten näytteiden säilytyslämpötilan tulisi olla 2–8 °C laboratorioon saapuessa. Näissä säilytysolosuhteissa näytteet pysyvät stabiileina PreservCyt-säilytysaineessa 3 kuukautta ennen DNA:n eristämistä.

Huomautus: Kuljetusaineeseen säilötyt kohdunkaulan irtosolunäytteet voidaan pitää testauslaboratorioon kuljetuksen aikana 2–30 °C:n lämpötilassa yön yli ja pakastaa uudestaan –20 °C:n lämpötilassa vastaanotettaessa.

Itse otetut emättimen harjanäytteet

QIASure Methylation Test -testi on tarkoitettu itse otetuista emättimen harjanäytteistä saadun bisulfiittikonvertoidun genomisen DNA:n analyysiin. Itse otetut emättimen harjanäytteet voidaan kerätä ja kuljettaa kuivina tai suolaliuoksessa (0,9-prosenttisessa, NaCl) ja säilyttää laboratoriossa PreservCyt-säilytysaineessa. PreservCyt-säilytysaineessa olevat näytteet säilyvät 2–8 °C:ssa tai huoneenlämmössä enintään 3 kuukautta.

Genomiset DNA-näytteet

Kun genominen DNA on eristetty, DNA-näytteitä voidaan säilyttää ja kuljettaa –30 °C... –15 °C:ssa 12 kuukauden ajan.

Näytteen valmistelu

QIASure Methylation Test -testi on validoitu kohdunkaulan irtosolunäytteistä peräisin olevan bisulfiittikonvertoidun genomisen DNA:n analyysiin. Genomisen DNA:n bisulfiittikonversio voidaan tehdä i) näytteestä aiemmin eristetystä DNA:sta ja DNA:n laatukselta tai ii) suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä. Suosittelemme seuraavaa menettelyä.

- **Näytteestä aiemmin eristetyn DNA:n bisulfiittikonversio ja DNA:n laatukselta**

Tässä protokollassa on ennen bisulfiittikonversioprotokollan aloittamista tehtävä DNA:n eristäminen, DNA-pitoisuuden mittaaminen ja optimaalisen eluaattimäärän jakaminen alikvootteihin. Protokolla on verifioitu käytettäväksi ZYMO Research -yhtiön EZ DNA Methylation™ Kit -sarjan kanssa. Suosittelemme seuraavia menettelyjä:

 - DNA:n eristäminen
Vakiotyypiset DNA:n eristys-sarjat (esim. kolonnityypiset ja magneettihelmiin perustuvat sarjat) ovat yhteensopivia QIASure Methylation Test -testin kanssa.
 - DNA-pitoisuuden mittaaminen
Mittaa DNA-pitoisuus ennen DNA:n bisulfiittikonvertointia. Sopivia järjestelmiä DNA-pitoisuuden mittaamiseen ovat Qubit® Fluorometer, NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (molemmat Thermo Fisher Scientific -yhtiön valmistamia) tai vastaavat.
 - DNA-eluaatin jakaminen alikvootteihin
Bisulfiittikonversio toimii parhaiten, kun DNA-syötteen määrä on 100 ng – 2 µg. Suositeltava määrä bisulfiittikonversioon on 200 ng. Jos DNA-pitoisuus on liian alhainen bisulfiittikonversioon, toista DNA:n eristäminen käyttäen suurempaa kliinisen näytteen syöttötilavuutta tai eluoi DNA pienempään eluotilavuuteen.
 - Bisulfiittikonversio EZ DNA Methylation Kit -sarjalla tehdään valmistajan ohjeiden mukaisesti.
Huomautus: EZ DNA Methylation Kit -sarjan ohjeiden mukaan näytteen DNA:n enimmäismäärä saa olla enintään 2 µg, jotta konversiotehokkuus olisi riittävän suuri (> 98 %).

- Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä

PreservCyt® Solution -säilytysaineeseen kerätyille kohdunkaulan irtosolunäytteelle suoraan tehty bisulfiittikonversio on verifioitu QIAGENin EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit -sarjalle. Suuren pitoisuuden DNA-näytteiden (1 ng – 2 µg) ohjeet perustuvat valmistajan julkaisussa *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion Handbook* antamiin suosituksiin seuraavia kohtia lukuun ottamatta:

- Protokollan vaihe 1. Ota 2,5 % kohdunkaulan irtosolunäytettä PreservCyt®-säilytysaineesta (esim. 500 µl 20 ml:n näytemäärästä) ja erota solupelletti sentrifugoimalla vähintään nopeudella 3390 x g. Poista supernatantti ja jätä solupelletti enintään 20 µl:aan PreservCyt-säilytysainetta. Käytä bisulfiittikonversioon tätä solupellettinäytettä ja jatka valmistajan protokollan vaiheesta 2.
- Buffer BL -puskuri: Älä lisää siirtäjä-RNA:ta.
- Bisulfiittikonversion DNA:n eluutiomäärä on 50 µl Buffer EB -puskuria kullekin näytteelle.

Bisulfiittikonversion yleiset suositukset

Bisulfiittikonversioreaktiota ei saa suorittaa alueella, jossa QIASure Master Mix -pääseosta säilytetään ja annostellaan, jotta vältetään reagenssien kontaminaatio.

QIASure-reaktiossa bisulfiittikonvertoidun DNA-syötteen määrä on 2,5 µl.

Jos näytteen sisäinen laatuohjelmointi on negatiivinen (eli ACTB:n C_T -arvot ovat $> 26,4$), näytteen DNA:n bisulfiittikonversion tuloksena saadun materiaalin laatu ja/tai määrä ei ole riittävä, ja järjestelmä määrittää näytteen virheelliseksi. Tee suositellut toimet, jotta saat hyväksyttävällä vaihteluvälillä olevan ACTB:n C_T -arvon:

- Näytteestä aiemmin eristetyn DNA:n bisulfiittikonversio ja DNA:n määräkontrolli: Toista bisulfiittikonversioreaktio käyttäen suurempaa DNA:n syötettä ja/tai toista DNA:n eristäminen käyttäen suurempaa kohdunkaulan irtosolunäytteen syötettä
- Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä: Toista bisulfiittikonversioreaktio käyttäen 10 %* PreservCyt-säilytysaineeseen kerätystä kohdunkaulan irtosolunäytteestä (esim. 2 ml 20 ml:n näytteestä).

Bisulfiittikonvertoitua DNA:ta voidaan säilyttää enintään 24 tunnin ajan 2–8 °C:ssa, enintään 5 päivän ajan –25...–15 °C:ssa ja enintään 3 kuukautta alle –70 °C:ssa. Bisulfiittikonvertoidun DNA:n toistuvaa pakastamista ja sulatusta on aina vältettävä. Näytteen laadun säilyttämiseksi pakastus- ja sulatusjaksoja saa olla enintään kolme.

* Suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä tehdystä bisulfiittikonversiossa voidaan käyttää suurempaa syötettä, jos onnistumisprosentti jää liian pieneksi näytteenoton vaihtelun vuoksi (joka voi johtua esim. riittämättömästä näytteenotosta).

Protokolla: QIASure Methylation Test -testin PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella*

Tärkeitä huomioita ennen aloittamista

- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Katso laitteen (tuotenumero 9002033 tai 9002032) käyttöopas.
- Tee ennen päivän ensimmäistä ajoa Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajo (95 °C 10 minuutin ajan).
- Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmisto tulkitsee PCR-tulokset automaattisesti. QIASure-sarja on ajettava Rotor-Gene Q MDx -laitteella käyttäen Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistoa. Tutustu Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistoon (tuotenumero 9022739) ja Epsilon Plug-In -lisäosaan ja lue molemmat käyttöoppaat.
- Eri näytetyypeille tarvitaan eri Rotor-Gene AssayManager v1.0 Assay Profiles -testiprofiilit. Varmista, että käytettävä profiili vastaa testattavan näytteen tyyppiä seuraavasti:
 - Kohdunkaulan raaputusnäytteiden QIASure-testiprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) on käytettävä lääkärin ottamista kohdunkaulan irtosolunäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han
 - Itse otettujen harjanäytteiden QIASure-testiprofiilia (tiedostosta AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) on käytettävä itse otetuista emättimen harjanäytteistä saatuun bisulfiittikonvertoituun DNA:han

Huomautus: Testillä voi testata vain yhden näytetypin kerrallaan. Eri testiprofiilit on optimoitu kullekin näytetyypille, joten on erittäin tärkeää valita oikea testiprofiili, jotta kunkin näytetypin tulokset olisivat optimaaliset.

* Rotor-Gene Q 5plex HRM -laite, joka on valmistettu tammikuussa 2010 tai myöhemmin. Valmistuspäivämäärä käy ilmi laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Ennen kuin aloitat

- Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyssä tietokoneessa on oltava asennettuna Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoversio v1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 4). Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application -ohjelmistosta on *Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application* -käyttöoppaassa.
 - QIASure Methylation Test -testiin tarvitaan erillinen Epsilon Plug-in -lisäosa (versio 1.0.1 tai uudempi). Tämän lisäosan voi ladata QIAGENin verkkosivulta osoitteesta <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-assaymanager#resources>. Tämä lisäosa on asennettava tietokoneeseen, jossa on asennettuna Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston versio 1.0.x (jossa x on suurempi tai yhtä suuri kuin 4).
 - QIASure Methylation Test -testiin tarvitaan testikohtainen profiili, jota käytetään Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmiston kanssa. Testiprofiili sisältää kaikki testin sykleihin ja analyysiin tarvittavat parametrit. QIASure Assay Profiles -testiprofiileja on kaksi:
 - Kohdunkaulan raaputusnäytteiden QIASure-testiprofiilia (tiedostossa AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap) käytetään lääkärin ottamiin kohdunkaulan irtosolunäytteisiin
 - Itse otettujen harjanäytteiden QIASure-testiprofiilia (tiedostossa AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) käytetään itse otettuihin emättimen harjanäytteisiin. Profiilit voidaan ladata QIASure Methylation Test -testin verkkosivulta osoitteesta <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiasure-methylation-test-kit-eu/>. Testiprofiili on tuotava Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoon.
- Huomautus: QIASure -sarja voidaan ajaa vain, jos Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistossa on määritetty tietyt asetukset.

Koko järjestelmän prosessiturvallisuuden vuoksi seuraavat pakolliset asetukset on määritettävä suljetun toimintatilan mukaisiksi:

- "Material number required" (Materiaalinumero pakollinen)
- "Valid expiry date required" (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen)
- "Lot number required" (Eränumero pakollinen)


Epsilon Plug-in -lisäosan asennus ja testiprofiilin tuominen

Epsilon Plug-in -lisäosan ja testiprofiilin asennus ja tuonti on selostettu *Rotor-Gene AssayManager Core Application User-* ja *Epsilon Plug-in User-*käyttöoppaissa.

- Lataa sekä Epsilon Plug-in -lisäosa että QIASure Assay Profile -testiprofiilin viimeisin versio QIAGENin verkkosivuilta.
- Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla EpsilonPlugin.Installation.msi-tiedostoa. Noudata näyttöön tulevia asennusohjeita. Tarkempia tietoja on *Rotor-Gene AssayManager Core Application* -käyttöoppaan kohdassa "Lisäosien asentaminen".

Huomautus: Koko järjestelmän prosessiturvallisuuden vuoksi määritä suljettu toimintatila valitsemalla Settings (Asetukset) -välilehden osiosta Work list (Työluettelo) valintaruudut Material number required (Materiaalinumero pakollinen), Valid expiry date required (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen) ja Lot number required (Eränumero pakollinen). Jos valintaruutuja ei ole jo valittu, valitse ne napsauttamalla.

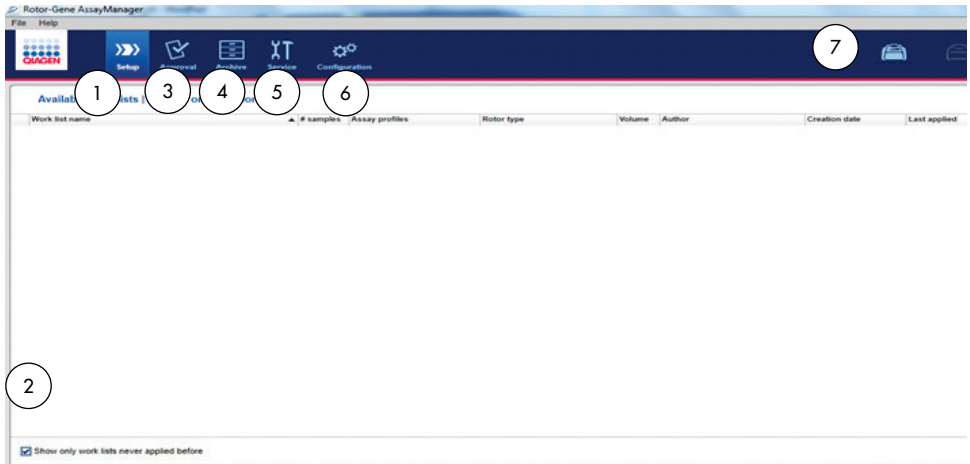
- Kun lisäosa on asennettu onnistuneesti, Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston pääkäyttäjän on tuotava AP_QIASure_V1_0_Y.iap-testiprofiili seuraavasti.

1. Avaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto napsauttamalla kuvaketta.  Rotor-Gene AssayManager -ikkuna avautuu (katso Kuva 1).



Kuva 1. Rotor-Gene AssayManager -kirjautumisikkuna.

2. Kirjaudu sisään Rotor-Gene AssayManager -ohjelmistoon käyttäjätunnuksellasi ja salasanallasi. Älä muuta "Closed" (Suljettu) -toimintatilan asetusta. Valitse OK. Näkyviin tulee Rotor-Gene Assay Manager -näyttö (katso seuraavaa kuvaa).



- 1 Set-up (Asetukset) -välilehti. Tässä välilehdessä voit hallita ja käyttää työluetteloita.
- 2 Jos valitset "Show only work lists never applied before" (Näytä vain uudet työluettelot), näkyviin tulevat vain uudet työluettelot.
- 3 Approval (Hyväksyntä) -välilehti. Voit hakea aiempia testejä (ajoja).
- 4 Archive (Arkisto) -välilehti. Voit hakea aiempia jo hyväksytyjä testejä (ajoja).

- 5 Service (Huolto) -välilehti. Voit tarkastella kaikkien ohjelmiston luomien tiedostojen auditointilokeja
- 6 Configuration (Konfigurointi) -välilehti. Voit määrittää kaikkien ohjelmistoparametrien asetukset
- 7 Rotor-Gene Q MDx -kuvakkeet.



Ei yhteyttä



Yhteys muodostettu

3. Valitse Configuration (Konfigurointi) -välilehti.
 4. Valitse Assay Profiles (Testiprofiilit) -välilehti.
 5. Valitse Import (Tuo).
 6. Valitse valintaikkunassa testiprofiili, jonka haluat tuoda (Assay Profile AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap kohdunkaulan irtosolunäytteille ja/tai Assay Profile AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap) ja valitse Open (Ava).
 7. Kun testiprofiili on tuotu, se voidaan ottaa käyttöön "Setup" (Asetukset) -välilehdessä.
- Huomautus: Testiprofiilin samaa versiota ei voi tuoda kahdesti.

Näytteiden käsittely Rotor-Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Yhdessä ajossa (testissä) voidaan testata enintään 70 bisulfiittikonvertoitua DNA-näytettä kalibraattorinäytteen ja mallittoman kontrollin lisäksi. Taulukossa 1 on esimerkki latauslohkon tai roottorin asettelusta QIASure Methylation Test -testiä tehtäessä. Numerot ilmaisevat paikat latauslohkossa ja lopulliset paikat roottorissa.

Taulukko 1. Levyn ja roottorin asettelu QIASure-sarjan ajossa Rotor-Gene Q MDx-laitteella

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



Putket on asetettava roottoriin taulukossa 1 kuvatulla tavalla. Testiprofiilissa määritetty automaattinen analyysi perustuu tähän järjestykseen. Jos järjestys on erilainen, tuloksista tulee poikkeavia.

Huomautus: Täytä kaikki käyttämättömät paikat tyhjiillä putkilla.

PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx -laitteilla, joissa on 72 putken roottori

Tee ennen päivän ensimmäistä ajoa Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajo (95 °C 10 minuutin ajan).

1. Luo käsiteltävästä näytteestä työluettelo seuraavasti:

- 1a. Käynnistä Rotor-Gene Q MDx -laite.
- 1b. Avaa Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto ja kirjaudu käyttäjän roolissa suljetussa toimintatilassa.
- 1c. Valitse "Setup" (Asetukset) -välilehti ja työluetteloiden hallinnassa New work list (Uusi työluettelo).
- 1d. Valitse käytettävissä olevien testiprofiilien luettelosta QIASure Assay Profile (QIASure-testiprofiili).
Huomautus: AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap-testiprofiilia on käytettävä kohdunkaulan irtosolunäytteille ja AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap-testiprofiilia itse otetuille emättimen harjanäytteille.
Huomautus: Testillä voi testata vain yhden näytetyypin kerrallaan.
- 1e. Valitse Move (Siirrä). Valittu testiprofiili siirtyy Selected assay profiles (Valitut testiprofiilit) -luetteloon. Testiprofiilin pitäisi nyt näkyä "Selected assay profiles" (Valitut testiprofiilit) -luettelossa.
- 1f. Kirjoita näytteiden lukumäärä vastaavaan kenttään.

- 1g. Kirjaa seuraavat QIASure-sarjan tiedot, jotka on painettu laatikon kanteen.
 - Materiaalinumero: 1102417
 - Viimeinen käyttöpäivä muodossa VVVV-KK-PP
 - Eränumero
- 1h. Valitse Samples (Näytteet) -vaihe. AssayManager-näyttöön tulee näkyviin luettelo näytteiden tiedoista. Luettelo kuvaa roottorin oletettua asetelua.
- 1i. Kirjoita luetteloon näytteen tunnistenumero(t) ja mahdolliset muut valinnaiset näytetiedot kommenttina jokaisen näytteen kohdalle.
- 1j. Valitse Properties (Ominaisuudet) -vaihe ja kirjoita työluettelon nimi (Kuva 2).

Kuva 2. Ominaisuudet.

- 1k. Valitse is applicable (on käytettävissä) -valintaruutu ja valitse sitten Apply (Käytä).
 - 1l. Tallenna työluettelo.
 Työluettelon voi tulostaa helpottamaan PCR:n valmistelua ja asetusten määrittämistä. Jos haluat tulostaa työluettelon, valitse Print work list (Tulosta työluettelo). Työluettelossa näkyvät myös näytteen tiedot.
 Huomautus: Työluettelon voi luoda sen jälkeen, kun ajo on määritetty laitteeseen, ja tallentaa ennen näytteiden lisäämistä laitteeseen.
2. Määritä QIASure-ajo.

PCR-reaktion kontaminaatoriskin vähentämiseksi on suositeltavaa käyttää PCR-kaappia, jossa on UV-säteilytysmahdollisuus.

QIASure Master Mix -pääseoksen annostelua ei saa tehdä alueella, jossa DNA:n bisulfiittikonversioreaktio tapahtuu.

Puhdista työalusta, pipetit ja putkiteline ennen DNA:ta hajottavan liuoksen käyttöä, jotta malli- tai nukleasikontaminaation riski pienenee.

Huomautus: Vaihda pipetin kärki jokaisen putken kohdalla. Näin vältät ei-spesifin mallin tai reaktioseoksen kontaminaation, jotka voivat aiheuttaa väriä positiivisia tuloksia.

2a. Sulata QIASure Master Mix -pääseos ja QIASure Calibrator -kalibraattori kokonaan ja suojaa QIASure Master Mix -pääseos valolta aina kun mahdollista.

Huomautus: Sulatusvaihe saa kestää enintään 30 minuuttia, jotta materiaali ei hajoa.

2b. Sekoita putkia varovasti kääntämällä ne ylösalaisin 10 kertaa ja käytä niitä sentrifugissa hetken aikaa ennen käyttöä.

2c. Annostele 17,5 µl käyttövalmista QIASure Master Mix -pääseosta kyseisiin liuskaputkiin. Reaktio voidaan valmistella huoneenlämmössä.

2d. Vie QIASure Master Mix -pääseos takaisin pakastimeen, jotta materiaali ei hajoa.

2e. Kuljeta putket eri alueelle testin kontrollien ja bisulfiittikonvertoitujen näytteiden annostelua varten.

2f. Lisää 2,5 µl vettä paikkaan 2, (NTC) (no template control, malliton kontrolli) (katso Taulukko 1 yllä). Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

2g. Lisää 2,5 µl QIASure Calibrator -kalibraattoria paikkaan 1 (katso Taulukko 1 yllä). Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas. Sulje putki korkilla.

2h. Lisää vastaavaan putkeen 2,5 µl bisulfiittikonvertoitua DNA:ta. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

2i. Kun olet täyttänyt 4 putken ryhmän, sulje putket korkilla.

Huomautus: PCR-putkia voidaan säilyttää pimeässä, 2–8 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia näytteiden pipetoinnin ja kokeen käynnistämisen välillä.

2j. Vie QIASure Calibrator -kalibraattori takaisin pakastimeen, jotta materiaali ei hajoa.

Huomautus: Vaihda pipetin kärki jokaisen putken kohdalla. Näin vältät ei-spesifin mallin tai reaktioseoksen kontaminaation, jotka voivat aiheuttaa väriä positiivisia tuloksia.

3. Valmistele Rotor-Gene Q MDx -laite ja aloita ajo (testi) seuraavasti:
 - 3a. Aseta 72-kuoppainen roottori roottoripidikkeeseen.
 - 3b. Aseta liuskaputket paikoilleen roottoriin: aloita paikasta 1 taulukon 1 esittämällä tavalla. Aseta kaikkiin käyttämättömiin paikkoihin tyhjä, korkilla suljettu putki.
Huomautus: Varmista, että ensimmäinen putki on asetettu paikkaan 1 ja että liuskaputket on asetettu oikeisiin suuntiin ja paikkoihin taulukon 1 esittämällä tavalla.
 - 3c. Kiinnitä lukitusrengas.
 - 3d. Lataa roottori ja lukitusrengas Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ja sulje laitteen kansi.
 - 3e. Valitse Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistossa joko vastaava työluettelo työluetteloiden hallinnasta ja valitse Apply (Käytä). Jos työluettelo on vielä auki, valitse Apply (Käytä).
Huomautus: Jos ajon työluetteloa ei ole luotu, kirjaudu Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmistoon ja tee kohdassa 1 kuvatut toimet ennen kuin jatkat ajon valmistelua.
 - 3f. Kirjoita ajon (testin) nimi.
 - 3g. Valitse käytettävä sykleri Cyclor selection (Syklerin valinta) -luettelossa.
 - 3h. Tarkista, että lukitusrengas on kiinnitetty oikein ja vahvista näytössä, että lukitusrengas on kiinnitetty.
 - 3i. Valitse Start experiment (Aloita testi).
QIASure Methylation Test -testin ajo alkaa.
4. Kun ajo on päättynyt, valitse Finish run (Lopeta ajo).
5. Vapauta ja hyväksy ajo.
 - Jos olet kirjautunut sisään Approver (Hyväksyjä) -roolissa, valitse Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään).
 - Jos olet kirjautunut sisään Operator (Käyttäjä) -roolissa, valitse Release (Vapauta).
6. Vapauta tulokset.
 - Jos valitsit Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään), testin tulokset tulevat näkyviin.

- Jos Release (Vapauta) -vaihtoehdon valitsi käyttäjän roolissa kirjautunut käyttäjä, jonkun toisen käyttäjän on kirjauduttava sisään "Approver" (Hyväksyjä) -roolissa ja valittava "Approval" (Hyväksyntä) -välilehti.
- Hae suodatinvaihtoehtojen avulla näkyviin testi, jonka haluat hyväksyä, ja valitse sitten Apply (Käytä).
- Tarkista ja hyväksy kunkin testinäytteen tulokset.

Siirry "Results" (Tulokset) -taulukossa sen näytteen kohdalle, jonka haluat hyväksyä. Jokaisen hyväksyntää odottavan tulosrivin lopussa on kolme näppäintä.

Valitse näytteen tuloksen kohdalla joko accept (hyväksy) tai reject (hylkää).

Huomautus: Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston automaattisesti INVALID (VIRHEELLINEN) -tilaan asettamaa tulosta ei voi enää muuttaa kelvolliseksi, vaikka hylkäisit tuloksen.

Valinnainen: Voit kirjoittaa näytettä koskevan kommentin Sample comment (Kommentti näytteestä) -sarakkeeseen.

- Valitse Release/Report data (Vapauta/raportoi tiedot).
- Valitse OK. Järjestelmä luo PDF-muotoisen raportin ja tallentaa sen automaattisesti ennalta määritettyyn kansioon. Kansiopolku on oletusarvoisesti: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports

Huomautus: Tätä polkua ja kansiota voi muuttaa Configuration (Konfigurointi) -välilehdellä.

- Siirry Archive (Arkisto) -välilehteen viemään raakadatan sisältävä .rex-tiedosto. Valitse haluamasi suodatusvaihtoehdot ja napsauta show assays (näytä testit). Valitse sitten Export .rex file (Vie .rex-tiedosto) ja OK. Ohjelmisto tallentaa .rex-tiedoston automaattisesti seuraavaan ennalta määritettyyn kansioon:

QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Experiments

Huomautus: Tämän polun ja kansion voi muuttaa välilehdessä Specify the .rex file export destination (Määritä .rex-tiedoston vientikansio).

Huomautus: Vianmäärittystä varten tarvitaan ajosta luotu tukipaketti. Tukipaketin voi luoda Approval (Hyväksyntä)- tai Archive (Arkisto) -välilehdellä. Katso lisätietoja

Rotor-Gene AssayManager Core Application -käyttöoppaan luvun Troubleshooting (Vianmääritys) kohdasta "Creating a support package" (Tukipaketin luominen). Käyttöopas on osoitteessa <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-assaymanager#resources>. Lisäksi auditointilokista (tapahtumahetki \pm 1 päivä) voi olla hyötyä. Auditointilokin voi hakea Service (Huolto) -välilehdestä (*Rotor-Gene AssayManager Core Application* -käyttöopas).

7. Poista Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ladatut materiaalit ja hävitä liuskaputket paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

Tulosten tulkitseminen

Analyysi tapahtuu täysin automaattisesti.

Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysoi ensin monistumiskäyriä ja voi määrittää epäyhteensopivat käyrät virheellisiksi niiden muodon ja kohina-amplitudin mukaan. Tällaiset käyrät on merkitty erityisellä merkinnällä (katso Taulukko 2).

Sen jälkeen Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysoi ajon kontrollit.

- Kalibraattori
- NTC

Huomautus: Ajon päätteeksi luodussa raportissa näkyvät ajon kontroleista saadut tulokset. Ohjelman virheellisiksi määrittämien tietojen kohdalla on erityinen merkintä.

Jos kaikki ajon kontrollit ovat määritysten mukaisia, Rotor-Gene AssayManager analysoi tuntemattomat näytteet.

Taulukossa 2 esitetään Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmiston yksittäiselle putkelle määrittämät virhemerkinnät ja niiden selitykset.

Taulukko 2. Virheelliseksi määritetyn näytteen merkinnät ja niiden selitykset

Merkintä	Järjestelmän tekemä määritys	Kuvaus
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Virheellinen)	Kohdearvo on suurempi kuin määritetyn arvoalueen yläraja. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo, esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo.
ASSAY_INVALID	Invalid (Virheellinen)	Testi on virheellinen, sillä vähintään yksi ulkoinen kontrolli on virheellinen.

BELOW_ACCEPTED_RANGE	Invalid (Virheellinen)	Kohdearvo on pienempi kuin määritetyn arvoalueen alaraja. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo, esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo.
CONSECUTIVE_FAULT	Invalid (Virheellinen)	Kohteen laskennassa käytetty kohde on virheellinen.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Invalid (Virheellinen)	Raakadatan monistuskäyrän muoto on tälle testille epätyypillinen. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri.
FLAT_BUMP	Invalid (Virheellinen)	Raakadatan monistuskäyrän muoto on tälle testille epätyypillinen (laakea kohouma). Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri (esimerkiksi virheellinen C_T -arvon määrittäminen).
IN_ACCEPTED_RANGE	Valid (Kelvollinen)	NTC-kontrollin signaalien C_T -arvot kohde-ACTB:lle ovat suurempia kuin 36.
INVALID_CALCULATION	Invalid (Virheellinen)	Kohteen laskenta epäonnistui.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Invalid (Virheellinen)	Monistuskäyrä ylittää kynnyksen useammin kuin kerran. Yksiselitteistä C_T -arvoa ei voida määrittää.
NO_BASELINE	Invalid (Virheellinen)	Ensimmäisen perustason alkuarvoa ei löydy.
NO_CT_DETECTED	Variable (Muuttuja)	Kohteelle ei havaittu C_T -arvoa.
NO_VALUE	Invalid (Virheellinen)	Kohteella ei ole arvoa, vaikka sillä edellytetään olevan arvo. Arvon ei tarvitse olla tietyllä alueella. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo (esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Warning (Varoitus)	Normalisoinnin aikana ilmeni poikkeama. Monistuskäyrässä näkyy vain oletusarvo. Tulosten oikeellisuus on tarkistettava manuaalisesti.
OTHER_TARGET_INVALID	Invalid (Virheellinen)	Saman näytteen toinen kohde on virheellinen.
SATURATION	Invalid (Virheellinen)	Fluoresenssin raakadatan saturaatio voimakkaasti ennen monistuskäyrän käänne pistettä.
SATURATION_IN_PLATEAU	Warning (Varoitus)	Fluoresenssin raakadatan saturaatio ennen monistuskäyrän tasannevaihetta.

SPIKE	Warning (Varoitus)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa piikki, mutta se on C_T -määritysalueen ulkopuolella.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Invalid (Virheellinen)	Monistuskäyrässä havaittiin piikki lähellä C_T -arvoa.
STEEP_BASELINE	Invalid (Virheellinen)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa jyrkästi nouseva perustaso.
STRONG_BASELINE_DIP	Invalid (Virheellinen)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa jyrkästi laskeva perustaso.
STRONG_NOISE	Invalid (Virheellinen)	Monistuskäyrän kasvuvaiheen ulkopuolella havaittiin voimakasta kohinaa.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Invalid (Virheellinen)	Monistuskäyrän kasvuvaiheessa (eksponentiaalisessa vaiheessa) havaittiin voimakasta kohinaa.
UNCERTAIN	Variable (Muuttuja)	AUDAS (Automatic Data Scan) -tulokset ovat ristiriidassa ydinanalyysin tulosten kanssa. Tietojen kelvollisuuden yksiselitteinen automaattinen arviointi ei ole mahdollista.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Variable (Muuttuja)	Havaittiin C_T -arvo kohteelle, jonka ei pitäisi monistua.
UNEXPECTED_VALUE	Invalid (Virheellinen)	Kohteella on arvo, mutta arvo ei ole odotettu. Kohdearvo voi olla C_T , päätetapahtuman fluoresenssi, pitoisuus tai laskettu arvo (esim. C_T -keskiarvo tai ΔC_T -keskiarvo).
UPSTREAM	Variable (Muuttuja)	Upstream-prosessi (esim. QIAasymphony) asetti näytteen tilaksi Invalid (virheellinen) tai Unclear (epäselvä). Huomautus: Rotor-Gene AssayManagerin toiminta epäselväksi merkittyjen näytteiden kohdalla voidaan määrittää AssayManager-ohjelmiston "Configuration" (Konfigurointi) -välilehdellä. Upstream-prosessien "Invalid" (Virheellinen) -merkintä aiheuttaa aina sen, että vastaava näyte määritetään virheelliseksi myös Rotor-Gene AssayManagerissa.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Invalid (Virheellinen)	Monistuskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa aaltoileva perustaso.

-
- Jos kaikki ajon kontrollit ovat kelvollisia, Rotor-Gene AssayManager v1.0 analysoi tuntemattomat näytteet. Näytteessä on oltava pieni määrä bisulfiittikonvertoitua DNA:ta, jotta tulokset voidaan tulkita. Tämä käy ilmi ylläpitogeeni ACTBC:n T -arvosta. Sen on oltava $\leq 26,4$, jotta Rotor-Gene AssayManager -ohjelmisto voi validoida näytteen.
 - Sen jälkeen ohjelmisto laskee *FAM19A4:n* ja *hsa-mir124-2:n* $\Delta\Delta C_T$ -arvot ja antaa tuloksen. Jos jokin $\Delta\Delta C_T$ -arvo on raja-arvon alapuolella, järjestelmä antaa kohteelle merkinnän "Hypermethylation positive" (Hypermetylaatioposiitiivinen).
Huomautus: Osittainen tai alhainen metylaatiotaso on luonnollinen ilmiö, jolla ei ole suoraa yhteyttä syövän kehittymiseen (toisin kuin hypermetylaatiolla).
 - Näyte on "Hypermethylation positive" (Hypermetylaatioposiitiivinen), jos ainakin yksi kohde saa merkinnän "Hypermethylation positive" (Hypermetylaatioposiitiivinen).

Vianmääritys

Näiden vianmääritysohjeiden tarkoitus on auttaa selvittämään mahdollisia ongelmia. Katso myös usein kysytyjä kysymyksiä teknisen tuen sivulta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat mielellään kaikkiin kysymyksiin näissä käyttöohjeissa esitetyistä tiedoista ja protokollista tai näytteiden ja testien käsittelyyn liittyvistä tekniikoista. (Katso yhteystiedot tämän käsikirjan takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston vianmäärityksestä on *Rotor-Gene AssayManager Core Application* -käyttöoppaassa

Yleinen käsittely

Näytteen DNA-pitoisuus on liian alhainen bisulfiittikonversioon

Tarkista DNA:n eristyksen tulos	Toista DNA:n eristäminen konsentroituneemmalla kliinisellä näytteellä
---------------------------------	---

Näyte hylätään: ACTB:n monistuminen on liian vähäistä tai sitä ei tapahdu lainkaan

- | | |
|---|--|
| a) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen. |
| b) Tarkista DNA-konsentraatti | Lisää bisulfiittikonversion DNA-syöte enimmäismäärään. Bisulfiittikonversioreaktio toimii parhaiten, kun DNA-syötteen määrä on 100 ng – 2 µg |
| c) Jos käytät protokollaa ”Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä”, tarkista kliinisen näytteen solukkuus | Toista bisulfiittikonversioreaktio käyttäen 10 % PreservCyt-säilytysaineeseen kerättyä kohdunkaulan irtosolunäytettä (eli 2 ml 20 ml:n näytemäärästä). |
| d) Tarkista bisulfiittikonvertoitu eluaatti | Toista bisulfiittikonversio ja lisää tarvittaessa DNA-syötteen määrää. |

Näyte hylätään: kohteet *FAM19A4* ja/tai *hsa-mir-124-2* ovat virheellisiä

Riittämätön sekoittuminen	Sekoita näytettä ja reaktioseosta pipetoimalla (noin 10 kertaa/putki). Toista näytteen käsittely.
---------------------------	---

Positiivinen kontrolli hylätään: yhden tai useamman kohteen monistuminen on liian vähäistä tai sitä ei tapahdu lainkaan

- | | |
|---|---|
| a) Pipetointivirhe tai reagensseja on jäänyt pois | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen. |
| b) Osittainen hajoaminen | Säilytä sarjan sisältöä –30...–15 °C:n lämpötilassa. Vältä toistuvaa jäätymistä ja sulamista. Pakastus- ja sulatusjaksoja saa olla enintään kolme. |
| c) PCR-reagenssit ovat osittain hajonneet | Säilytä sarjan sisältöä –30...–15 °C:n lämpötilassa ja suojaa reaktioseokset valolta. Vältä toistuvaa jäätymistä ja sulamista. |
| d) Liuskaputket ovat vaihtuneet keskenään | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. |
| e) Viimeinen käyttöpäivä | Tarkista käytetyn sarjan viimeinen käyttöpäivä. |
| f) Viive näytteiden pipetoinnin ja ajon alkamisen välillä | Kun näytteet on annosteltu PCR-reaktioita varten, PCR-reaktioseoksia voi säilyttää pimeässä 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 30 minuutin ajan ennen ajon käynnistämistä laitteessa. |

Malliton kontrolli (No template control, NTC) hylätään

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Pipetointivirhe | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen. |
| b) | Ristikontaminaatio | Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit. Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita yleisesti hyväksytyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi. |
| c) | Reagenssin kontaminaatio | Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit. Käsittele näytteitä, sarjan komponentteja ja tarvikkeita yleisesti hyväksytyjen käytäntöjen mukaan, jotta siirtymiskontaminaatiota ei tapahtuisi. |
| d) | Liuskaputket ovat vaihtuneet keskenään | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. |
| e) | Viive näytteiden pipetoinnin ja ajon alkamisen välillä | Kun näytteet on annosteltu PCR-reaktioita varten, PCR-reaktioseoksia voi säilyttää pimeässä 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 30 minuutin ajan ennen ajon käynnistämistä laitteessa. |
| f) | Koettimen hajoaminen | Suojaa reaktioseokset valolta. Tarkista, onko fluoresenssikäyrässä vääriä positiivisia signaaleja. |

Näytteen signaaleja puuttuu tai ne ovat heikkoja, mutta kontrolliajo onnistuu

- | | | |
|----|------------------------|--|
| a) | Inhiboivia vaikutuksia | Kun teet bisulfiittikonversiota, tarkista aina sentrifugoinnin jälkeen, ettei suodattimessa ole puskuriliuoksen jäämiä. Toista bisulfiittikonversio. |
| b) | Pipetointivirhe | Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen. |

Jos ongelma ei poistu, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen tukipalveluun.

Rajoitukset

QIASure Methylation Test -testin reagensseja saa käyttää ainoastaan in vitro -diagnostiikassa.

PCR-testien käyttäminen edellyttää hyvien laboratoriokäytäntöjen noudattamista, joihin kuuluu molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden huolto sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämän sarjan mukana toimitetut reagenssit ja ohjeet on validoitu suorituskyvyltään optimaaliseksi.

QIASure Methylation Test -testiä saavat käyttää laboratoriotyöntekijät, jotka ovat saaneet Rotor-Gene Q MDx -laitteiden ja Rotor-Gene AssayManager v1.0 -ohjelmiston käyttökoulutusta.

Tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet real-time PCR -tekniikoita ja diagnostisia in vitro -menetelmiä koskevaa erityisopastusta ja -koulutusta. Saatujen diagnostisten tulosten tulkinnassa on otettava huomioon myös muut kliiniset löydökset tai laboratoriolöydökset.

Optimaalisten PCR-tulosten saamiseksi käyttöoppaan ohjeita on noudatettava tarkasti.

Kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painettuja viimeisiä käyttöpäivämääriä on noudatettava. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Järjestelmä saattaa määrittää vääriksi negatiivisiksi näytteet, joissa DNA:n laatu tai määrä on alhainen (esim. ACTB:n C_T -arvot juuri ja juuri hyväksyntärajoissa, C_T -arvot 25–26,4). Tällöin suositellaan kunkin näytteen uusintatestausta yksittäin. Negatiivinen tulos toistetussa testissä tarkoittaa, että näyte on hypermetylaationegatiivinen. Positiivinen tulos tarkoittaa, että näyte on hypermetylaatioposiivinen.

Kaikki QIASure Methylation Test -testin reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Muunlainen käyttö saattaa heikentää testin suorituskykyä.

QIASure Methylation Test -testi on validoitu HPV-positiivisille naisille.

QIASure Methylation Test -testi on validoitu kohdunkaulan irtosolunäytteille, jotka on kerätty ja säilöty PreservCyt- tai STM-säilytysaineeseen, sekä itse otetuille emättimen harjanäytteille, jotka on säilöty suolaliuokseen (0,9-prosenttinen NaCl). QIASure Methylation Test -testiä ei ole validoitu kohdunkaulan irtosolunäytteille, jotka on kerätty ja säilöty formaldehydiä sisältävään näytteenottoalustaan, kuten BD® Surepath® tai vastaava. Formaldehydi aiheuttaa DNA:n ristiinlinkittymistä, mikä voi heikentää QIASure Methylation Test -testin suorituskykyä.

Vain Rotor-Gene Q MDx -laite on validoitu käytettäväksi QIASure Methylation Test -testin PCR Assay -testin kanssa.

Tuotteen off label -käyttö ja/tai komponenttien muokkaaminen mitätöi Self-screen B.V -yhtiön vastuun.

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suoritustaso kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita Self-screen B.V -yhtiön suoritustasoa koskevat tutkimukset eivät kata.

Suorituskyky

Toteamisraja (LOD)

QIASure Methylation Test -testin analyttinen herkkyys määritettiin 95 %:n toteamisrajana (95% LOD). Toteamisrajan määrittämisessä käytettiin plasmidin sarjalaimennosta, joka sisälsi kaikki kolme amplikonisekvenssiä (*ACTB*, *FAM19A4* ja *hsa-mir124-2*; vaihteluväli 750 000–0,25 kopiota per PCR-ajo). Kohteiden 95 %:n toteamisrajaksi arvioitiin alhaisin plasmidin laimennos, joka tuotti vähintään 35 positiivista tulosta 36:sta ($C_T < 40$). Yhteensä tehtiin 12 testiä, joissa oli neljä eri käyttäjää (1 ajo/käyttäjä/päivä), kolme eri erää ja kolme eri RGQ-järjestelmää. Jokaisessa testissä testattiin 11 plasmidilaimennosta kolmesti. 95 %:n toteamisraja oli kaikissa kolmessa kohteessa 7,5 kopiota per PCR-ajo.

Lineaarisuus

QIASure-testin lineaarisuus arvioitiin 95 %:n toteamisrajan määrittämiseksi tehtyjen 12 testin tietojen perusteella. Testin kahdessa kohteessa (*FAM19A4* ja *hsa-mir124-2*) sekä vertailukohteessa (*ACTB*) lineaarisen monistumisen vaihteluväli oli 750 000–7,5 kopiota per PCR-ajo.

Tarkkuus

QIASure Methylation Test -testin tarkkuus määritettiin analyysin sisäisenä vaihteluna (joka tarkoittaa samat pitoisuudet sisältävien näytteiden useiden tulosten välistä vaihtelua samalla laitteella) ja analyysin kokonaisvarianssina (joka tarkoittaa useiden tulosten vaihtelua eri käyttäjien, laitteiden, erien ja laboratorioiden välillä). Testauksessa käytettiin korkean riskin HPV-positiivisesta kohdunkaulan irtosolunäytteestä saatua bisulfiittikonvertoitua DNA:ta, joka oli testissä todettu hypermetylaatioposittiiviseksi ja tuotti sekä *FAM19A4*:n että *hsa-mir124-2*:n osalta signaalin, joka vastasi noin 3 kertaa toteamisrajan pitoisuutta. Testissä tehtiin kahdennettuna 8 ajoa, joissa oli neljä eri käyttäjää (1 ajo/käyttäjä/päivä), kaksi eri erää ja

kolme eri RGQ-järjestelmää kahdessa eri laboratoriossa, ja tulokseksi saatiin 16 datapistettä näytettä kohti. Testissä määritettiin C_T - ja $\Delta\Delta C_T$ -arvojen variaatiokerroin (coefficient of variation, CV) (Taulukko 3).

Taulukko 3. C_T - ja $\Delta\Delta C_T$ -arvojen variaatiokerroin metylaatioposiitivisessa kohdunkaulan irtosolunäytteessä

	Näytetyyppi	Testien välinen vaihtelu	Testin kokonaisvariassi
C_T -arvo	Näytteen sisäinen laatukontrolli (ACTB)	0,3 %	1,32 %
	<i>FAM19A4</i>	1,02 %	1,52 %
	<i>hsa-mir124-2</i>	1,16 %	1,64 %
$\Delta\Delta C_T$ -arvo	<i>FAM19A4</i>	3,70 %	5,97 %
	<i>hsa-mir124-2</i>	4,21 %	5,75 %

Testatulla pitoisuudella näytteen C_T -arvojen tilastollinen kokonaishajonta oli 1,32 % näytteen sisäisen laatukontrollin (ACTB) osalta, 1,52 % kohteen *FAM19A4* osalta ja 1,64 % kohteen *hsa-mir124-2* osalta. Testatulla pitoisuudella näytteen $\Delta\Delta C_T$ -arvojen tilastollinen kokonaishajonta oli 5,97 % kohteen *FAM19A4* osalta ja 5,75 % kohteen *hsa-mir124-2* osalta.

Häiritsevät aineet

Mahdollisten PCR-vaikutusten perusteella valitut inhiboivat aineet olivat bisulfiittikonversiosarjan desulfonointi- ja pesuliuos. Alkuperäisessä näytteessä mahdollisesti olevia aineita ei testattu, koska näytteen DNA puhdistetaan silikahelmillä kahdesti (alkuperäisestä näytteestä eristämisen ja bisulfiittikonversion jälkeen). Desulfonointi- ja pesuliuosjäämien havaittiin häiritsevän PCR-ajoa, mikä havaittiin näytteen sisäisen laatukontrollin virheellisestä testituloksesta.

Kliininen suorituskyky

HPV-positiiviset kohdunkaulan irtosolunäytteet*

QIASure Methylation Test -testin kliininen suorituskyky kohdunkaulan intraepiteelialisten neoplasioiden (CIN 3) ja kohdunkaulan syövän (CIN 3+) toteamisessa määritettiin testaamalla 267 korkean riskin HPV-positiivista kohdunkaulan irtosolunäytettä*+ 18–85-vuotiailta naisilta. Yhdeksässä näytteessä (3,4 %) ACTB:n C_T-arvo oli suurempi kuin 26,4, ja ne määritettiin virheellisiksi. Kelvollisiksi määritetyt 258 kohdunkaulan irtosolunäytettä jakautuivat seuraavasti: 117 näytettä naisilta, joilla ei 18 kuukauden seurannassa ollut todettu CIN 2 -asteista tai vaikeampaa muutosta (taulukossa lyhennetty muotoon ≤ CIN 1), 42 näytettä, joissa CIN 2 -asteinen muutos, 30 näytettä, joissa CIN 3 -asteinen muutos, 59 näytettä, joissa levyepiteelikarsinoma, ja 10 näytettä, joissa adenokarsinoma. Kohdunkaulan irtosolunäytteet kerättiin PreservCyt-säilytysaineeseen (Hologic). Kohdunkaulan irtosolunäytteistä eristettiin DNA, ja bisulfiittikonversioreaktion syötteenä (ZYMO Research -yhtiön EZ DNA Methylation Kit -sarja) käytettiin 250 ng DNA:ta. Tästä 250 ng:stä modifioitua DNA:ta PCR-ajossa käytettiin 20 % (mikä vastaa 50 ng:tä alkuperäistä kohde-DNA:ta per PCR-ajo). QIASure Methylation Test -testin positiivisuusasteet kliinisen päätepisteen mukaan on esitetty alla (Taulukko 4).

Taulukko 4. QIASure Methylation Test -testin positiivisuusaste

Kliininen päätepiste	Fraktio	Positiivisuusaste (95 %:n luottamusväli)
≤ CIN 1	24/117	20,5 % (14,1–28,8)
CIN 2	16/42	38,1 % (24,8–53,4)
CIN 3	20/30	66,7 % (48,4–84,0)
Levyepiteelikarsinoma	59/59	100,0 % (94,0–100,0)
Adenokarsinoma	10/10	100,0 % (69,0–100,0)

Korkean riskin HPV-positiivisten kohdunkaulan irtosolunäytteiden joukossa herkkyys CIN 3+ -asteen osalta on 89,9 % (89/99; 95 %:n luottamusväli: 82,2–94,5) ja karsinoman osalta 100 % (69/69, 95 %:n luottamusväli: 94–100). †

* Lääkärin ottamat kohdunkaulan irtosolunäytteet.

† Huomautus: Kohteiden hypermetylaatio niiden naisten näytteissä, joilla on pitkälle edennyt CIN-lesio ja/tai kohdunkaulan syöpä, saattaa jäädä havaitsematta näyteenotossa tapahtuvan vaihtelun vuoksi (joka voi johtua esim. riittämättömästä näyteenotosta).

HPV-positiiviset itse otetut emättimen harjanäytteet

QIASure Methylation Test -testin kliininen suorituskyky kohdunkaulan intraepiteeliaalisten neoplasoidien (CIN 3) ja kohdunkaulan syövän (CIN 3+) toteamisessa itse otetuista emättimen harjanäytteistä määritettiin testaamalla 247 korkean riskin HPV-positiivista emättimen irtosolunäytettä. Näytteistä 14:ssä (5,7 %) ACTB:n C_T-arvo oli suurempi kuin 26,4, ja ne määritettiin virheellisiksi. Kelvollisiksi määritetyt itse otetut harjanäytteet jakautuivat seuraavasti: 148 näytettä naisilta, joilla todettiin 18 kuukauden seurannassa ≤ CIN 1 -asteinen muutos, 24 näytettä, joissa CIN 2 -asteinen muutos, 50 näytettä, joissa CIN 3 -asteinen muutos, 8 näytettä, joissa levyepiteelikarsinooma ja 3 näytettä, joissa adenokarsinooma. Emättimen irtosolunäytteistä eristettiin DNA, ja bisulfiittikonversioreaktion syötteenä (ZYMO Research -yhtiön EZ DNA Methylation Kit -sarja) käytettiin 250 ng DNA:ta. Tästä 250 ng:stä bisulfiittikonvertoitua DNA:ta PCR-ajossa käytettiin 20 % (mikä vastaa 50 ng:tä alkuperäistä kohde-DNA:ta per PCR-ajo). QIASure Methylation Test -testin positiivisuusasteet kliinisen päätepisteen mukaan on esitetty alla (Taulukko 5).

Taulukko 5. QIASure Methylation Test -testin positiivisuusaste

Kliininen päätepiste	Fraktio	Positiivisuusaste (95 %:n luottamusväli)
≤ 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)
Levyepiteelikarsinooma	8/8	100,0 % (63,1–100,0)
Adenokarsinooma	3/3	100,0 % (29,2–100,0)

Korkean riskin HPV-positiivisten itse otettujen emättimen harjanäytteiden joukossa herkkyys CIN 3+ -asteen osalta on 72,1 % (44/61; 95 %:n luottamusväli: 59,7–81,9) ja karsinooman osalta 100 % (11/11; 95 %:n luottamusväli: 72–100).*

* Huomautus: Kohteiden hypermetylaatio niiden naisten näytteissä, joilla on pitkälle edennyt CIN-leesio ja/tai kohdunkaulan syöpä, saattaa jäädä havaitsematta näytteenotossa tapahtuvan vaihtelun vuoksi (joka voi johtua esim. riittämättömästä näytteenotosta).

FAM19A4:n ja *hsa-mir124-2:n* suorituskyky pitkälle edenneiden muuntuvien CIN-lesioiden toteamisessa

Isäntäsolun promootorien metylaation analyysillä tunnistetaan spesifisti pitkälle edenneitä CIN-lesioita, joilla on syövän kaltainen metylaatioprofiili ja odotetusti suuri riski kehittyä syöväksi lyhyellä aikavälillä [7, 8]. *FAM19A4:n* ja *hsa-mir124-2:n* promootorin hypermetylaation analyysin suorituskyky määritettiin testaamalla 29 korkean riskin HPV-positiivista näytettä naisilta, joilla oli pitkälle edennyt muuntuva CIN 2/3-asteinen muutos, sekä 19 korkean riskin HPV-positiivista näytettä naisilta, joilla oli varhaisvaiheen muuntuva CIN 2/3-asteinen muutos. Metylaatio liittyi erityisesti pitkälle edenneeseen sairauteen, ja kaikki pitkälle edenneet CIN 2/3 -asteiset leesiot (100 %: 29/29; 95 %:n luottamusväli: 88–100) määritettiin hypermetylaatioposiitiviksi verrattuna 47 %:iin (9/19; 95 %:n luottamusväli: 27–69) aikaisista CIN 2/3 -asteisista leesiosta.

Robustisuus

QIASure Methylation Test -testin robustisuus määritettiin vertaamalla QIASure Methylation Test -testillä saatujen tulosten ja testin vain tutkimuskäyttöön tarkoitettulla versiolla (Research Use Only, RUO) saatujen tulosten yhtäpitävyyttä. Testauksessa käytettiin 10:stä suuren riskin HPV-positiivisesta kohdunkaulan irtosolunäytteestä saatua bisulfiittikonvertoitua genomista DNA:ta. Näytteistä 5 oli aiemmin todettu hypermetylaationegatiiviseksi molempien markkerien suhteen ja 5 metylaatioposiitiviseksi (eli vähintään toisen markkerin osalta). Kahdennetussa testauksessa oli neljä käyttäjää 8 ajossa (yksi ajo/käyttäjä/päivä), kaksi eri erää ja kolme eri Rotor-Gene Q MDx -laitetta kahdessa eri laboratoriossa. Kullekin näytteelle saatiin 16 datapistettä (Taulukko 6).

Taulukko 6. QIAsure Methylation Test -testin ja sen RUO-version välinen yhtäpitävyys

Näytteen numero	RUO-tulos	Yhtäpitävyys, laboratorio 1 verrattuna RUO-versioon	Yhtäpitävyys, laboratorio 2 verrattuna RUO-versioon
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)
Välisumma		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)
Välisumma		100 % (40/40)	100 % (40/40)
Yhteensä (positiiviset ja negatiiviset)		96,25 % (77/80)	96,25 % (77/80)

Neljä viidestä aiemmin metylaationegatiiviseksi todetusta näytteestä oli 100-prosenttisesti yhtäpitäviä, kun QIAsure Methylation Test -testiä käytettiin kummassakin laboratoriossa. Näytteen 3 yhtäpitävyysprosentti oli 62,5 % (5/8) kummassakin laboratoriossa. *FAM19A4*-kohteeseen liittyvä havaittu variaatio oli lähellä testin raja-arvoja. Metylaationegatiivisten näytteiden yleinen yhtäpitävyys oli 92,5 % (37/40).

Kaikki aiemmin metylaatioposiivisiksi määritetyt 5 näytettä olivat 100-prosenttisesti yhtäpitäviä vertailutestin kanssa, joten yleinen yhtäpitävyys oli 100 % (40/40).

Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä












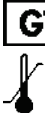




Protokolla "Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä" verifioitiin tekemällä 119:lle kohdunkaulan raaputusnäytteelle vertailuprotokolla (näytteestä aiemmin eristetyn DNA:n bisulfiittikonversio ja DNA:n määräkontrolli) ja QIASure Methylation Test -testi. Suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä tehdyn bisulfiittikonversion onnistumisaste käyttäen 2,5 %:n syötettä oli 95,8 % (114/119) ja kasvoi 100 %:iin, kun virheellisiksi määritetyt näytteet testattiin uudelleen käyttäen 10 %:n syötettä. QIASure Methylation Test -testin yhtäpitävyys kahden bisulfiittikonversioprotokollan välillä oli 90,8 % (108/119; kappa-kerroin 0,75).

Lähdeviitteet

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.

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Selitys
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte
	CE-IVD-merkintä
	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	Komponentit
	Sisältö
	Numero
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeen versiota ja n on versionumero
	GTIN-numero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Suojattava auringonvalolta
	Katso käyttöohjeet
	Huomio

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tuen sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support, soita ilmaisnumeroon 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
QIASure Methylation Test Kit	72 reaktioon: 2 pääseosta, 2 kalibraattoria.	616014
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR -sykləri ja High Resolution Melt -analysoattori, jossa 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle, asennuksen ja koulutuksen	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR -sykləri ja High Resolution Melt -analysoattori, jossa 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1 vuoden takuun osille ja työlle. Ei sisällä asennusta ja koulutusta	9002032
Rotor-Gene Q MDx:n tarvikkeet		
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä. 72 kpl 0,1 ml:n putkia	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
Rotor-Gene AssayManager – rutiinitestaukseen Rotor-Gene Q MDx -laitteilla		
Rotor-Gene AssayManager	Ohjelmisto rutiinitestaukseen Rotor-Gene Q- ja QIASymphony RGQ -laitteilla; yhdellä lisenssillä varustettu ohjelmisto asennukseen yhdelle tietokoneelle	9022739

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tämä sivu on tarkoituksella jätetty tyhjäksi.

Asiakirjan muutoshistoria

Päivämäärä	Muutokset
R4, heinäkuu 2019	Tarkistettu työnkulkukaavio kohdassa Menetelmän toimintaperiaate; lisätty EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit kohtaan Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen; tarkistettu tietoruutu kohdassa Turvallisuustiedot; lisätty tiedot RGQ MDx 5-plex HRM -laitteen lämmitysajosta; tarkistettu kohta Näytteen valmistelu; lisätty vianmäärittystietoja; lisätty osio Bisulfiittikonversio suoraan kohdunkaulan irtosolunäytteestä kohtaan Suorituskyky; päivitetty Kirjallisuusviitteet; päivitetty ulkoasu

QIASure Methylation Test -testin rajoitettu lisenssisopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen asiakirjojen ja tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa asiakirjoissa, tässä käyttöoppaassa ja lisämateriaalissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin nimenomaisesti ilmoitettujen käyttöoikeuksien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjät eivät loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi käännyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannaakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

QIASure Methylation Test -testin laillinen valmistaja on Self-screen B.V.

QIASure Methylation Test -testin valmistaja on Self-screen B.V. ja jakelija Euroopassa QIAGEN.

Tavaramerkit: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIASymphony[®], *digene*[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN-ryhmä); BD[®], SurePath[®] (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop[®] (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyte[®] (Hologic, Inc.); Qubit[®] (Molecular Probes, Inc.). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

06-2019 HB-2304-004 1117742 © 2019 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com