

2019. június

QIASure Methylation Test használati útmutató (kézikönyv)



1-es verzió

Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM készülékkel való használatra

IVD

In vitro diagnosztikai használatra

CE

REF

616014



Self-screen B.V., Biothof 15-1, 1098 RX Amsterdam, HOLLANDIA

R4 **MAT**

1117742HU

Tartalom

Alkalmazási terület.....	4
Összefoglalás és magyarázat.....	5
Az eljárás elve.....	5
Szállított anyagok.....	7
A kit tartalma.....	7
Szükséges, de nem biztosított anyagok.....	7
Figyelmeztetések és óvintézkedések.....	10
Biztonsági információk.....	10
Általános óvintézkedések.....	10
Az AssayManager profilokkal kapcsolatos óvintézkedések.....	12
A reagensek tárolása és kezelése.....	13
A minták kezelése és tárolása.....	14
Minta-előkészítés.....	15
Általános ajánlások a biszulfid-konverzióhoz.....	17
Protokoll: QIASure Methylation Test PCR a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM készüléken.....	18
Az eredmények értelmezése.....	30
Hibaelhárítási útmutató.....	34
Korlátozások.....	37
Teljesítményjellemzők.....	39
Kimutatási határ (LOD).....	39
Linearitás.....	39
Precizitás.....	39

Zavaró anyagok.....	40
Klinikai teljesítmény	41
Robusztusság	43
Irodalomjegyzék.....	46
Szimbólumok.....	47
Kapcsolatfelvételi adatok	48
Rendelési információk	49
A dokumentum átdolgozási előzményei.....	52

Alkalmazási terület

A QIASure Methylation Test egy multiplex real-time metiláció-specifikus PCR assay a *FAM19A4* és a *hsa-mir124-2* gén promóter hipermetilációjának kimutatására. A QIASure Methylation Test alkalmazásával az alábbi módszerekkel levett mintákból izolált, biszulfít-konvertált DNS vizsgálata végezhető el:

- A *digene*[®] HC2 DNA Collection Device eszközzel nyert (orvos által vett) méhnyaki minták
- Kefe vagy seprű típusú eszközzel vett és PreservCyt[®] Solution folyadékba helyezett (orvos által vett) méhnyaki minták
- Kefe vagy seprű típusú eszközzel vett hüvelyi minták (a beteg saját magának veszi le)

Használati javallatok:

1. Utánkövető tesztként, pozitív humán papillomavírus (HPV) teszttel rendelkező nőknél annak megállapításához, hogy beutalót kell-e adni kolposzkópos vagy egyéb utánkövető eljárások elvégzésére.
2. Utánkövető tesztként, olyan nőknél, akiknél a méhnyakkenet vizsgálata ismeretlen jelentőségű atípusos laphámsejtek (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US) jelenlétét igazolta, annak megállapításához, hogy beutalót kell-e adni kolposzkópos vagy egyéb utánkövető eljárások elvégzésére.

A termék az in vitro diagnosztikai eljárásokban, molekuláris biológiai technikákban és a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System kezelésében jártas professzionális felhasználók, például technikusok és laborasszisztensek általi használatra szolgál.

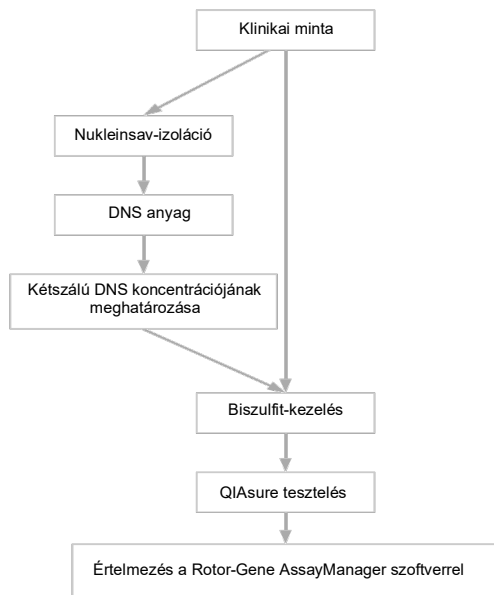
Összefoglalás és magyarázat

A DNS-metiláció a magasabb rendű organizmusok normál fejlődéséhez fontos biokémiai folyamat (1). A folyamat során egy metilcsoport kerül hozzáadásra a citozin nukleotid pirimidingyűrűjének 5. pozíciójában. Emellett az abnormális DNS-metilációs mintázatok fontos szerepet játszanak a karcinogenezisben. A *FAM19A4* és/vagy *hsa-mir124-2* gének promóter-hipermetilációját mutatták ki több humán rákbetegségben és rákos sejtvonalakban, beleértve a méhnyakrákot és az endometriális rákot (2–6). A gazdasejt promóter metiláció elemzése specifikusan kimutatja a rákbetegségeket és az úgynevezett „előrehaladott” cervicalis intraepithelialis neoplasia (CIN) léziókat, amelyek rákbetegségrű metilációs profilt mutatnak, és amelyeknél rövid távon magas a rákbetegséghez vezető progresszió kockázata (3, 7, 8, 10). A QIASure assay lehetővé teszi a *FAM19A4* és *hsa-mir124-2* gének promóter-hipermetilációjának kimutatását méhnyaki vagy hüvelyi mintákból izolált, biszulfít-konvertált DNS-ben, az ACTB (béta-aktin) gént használva a minta belső minőség-ellenőrzéseként.

Az eljárás elve

A QIASure Methylation Test egy multiplex real-time PCR teszt, amely a *FAM19A4* és a *hsa-mir124-2* tumorszuppresszor gének metilált promóter régióit és egy referenciagén metilációra nem specifikus fragmentumát amplifikálja. A készletben 2 cső QIASure Master Mix és 2 cső QIASure Calibrator található. A mesterkeverék a klinikai mintákból készített, biszulfít-konvertált DNS amplifikációjára szolgál. A mesterkeverék a célgének primereit és próbáit, valamint a minta belső minőség-ellenőrzéseként szolgáló referenciagént tartalmazza. A kalibrátor a *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* és ACTB ampikonok szekvenciáit tartalmazó linearizált plazmid.

Az eljárás munkafolyamata



A QIASure assay a Rotor-Gene Q MDx készüléken fut, és a Rotor-Gene AssayManager[®] szoftver automatikusan elvégzi az adatok elemzését és értelmezését. A C_T -érték (ciklus küszöbérték) a háttértől megkülönböztethető fluoreszcens jel észleléséhez szükséges PCR-ciklusok számát képviseli, ami korrelációt mutat a mintában jelen lévő célmolekulák számával. A QIASure assay a *FAM19A4* vagy a *hsa-mir124-2* célgének C_T -értéke és a referenciagén (ACTB) C_T -értéke közötti különbséggént számítja ki a ΔC_T értékét. Ez a ΔC_T a *FAM19A4* vagy a *hsa-mir124-2* gén promóter-metilációs szintjének relatív kvantitatív értéke. A normalizáláshoz a kalibrátorminta ΔC_T -értékét kivonják a *FAM19A4* vagy a *hsa-mir124-2* célgének ΔC_T -értékéből, ami a $\Delta\Delta C_T$ -értéket eredményezi (9). A kalibrátor egy standardizált, alacsony kópiaszámú plazmid DNS-minta, amelyben ismert a három célgén (tehát a *FAM19A4*, *hsa-mir124-2* és ACTB) kópiaszáma.

Szállított anyagok

A kit tartalma

QIASure Methylation Test		72
Katalógusszám		616014
Reakciók száma		72
QIASure Master Mix (mestermix) (2 cső)	Barna színű	630 µl
QIASure Calibrator (kalibrátor) (2 cső)	Átlátszó színű	25 µl
QIASure Methylation Test használati útmutató (kézikönyv)		1

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheet, SDS) tartalmazzák, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

A beteg által levett minták előkészítéséhez való fogyóeszközök és reagensek

- Hologic PreservCyt® Solution

A biszulfít-konverzióhoz szükséges fogyóeszközök és reagensek

Az igazolt biszulfít-konverziós készletek közé tartoznak az alábbiak:

- EZ DNA Methylation Kit (ZYMO Research, katalógusszám: D5001 vagy katalógusszám: D5002)
- EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit (QIAGEN, katalógusszám: 59720)

Fogyóeszközök a Rotor-Gene Q MDx készülékhez

- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (katalógusszám: 981103)
- Tisztított víz (pl., molekuláris biológiai munkához alkalmas minőségű, desztillált vagy ionmentes)

Eszközök

- PCR-hez való, állítható pipetták* (1–10 µl; 10–100 µl)
- Egyszer használatos kesztyű
- Asztali centrifuga*, > 10 000 rpm sebességű
- Vortex keverő*
- Qubit® (Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: Q33216), NanoDrop® 3300 Fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: ND-3300), vagy egyenértékű*

Real-time PCR-hez szükséges eszközök

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (katalógusszám: 9002033) vagy Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM készülék (katalógusszám: 9002032)[†]
- Rotor-Gene AssayManager Core Application 1.0.x szoftververzió (ahol az x legalább 4)
- Rotor-Gene AssayManager Epsilon Plug-in beépülő modul telepítve, 1.0.x verzió (ahol az x legalább 1)
- QIASure Assay Profile (az AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap fájlból) (ahol az Y legalább 1) az orvosok által vett méhnyaki mintákból nyert és biszulfít-konvertált DNS-en alapuló alkalmazáshoz

* Ellenőrizze, hogy a műszerek a gyártó ajánlásai szerint rendszeresen lettek-e ellenőrizve és kalibrálva.

[†] 2010. január vagy annál későbbi gyártási dátumú Rotor-Gene Q 5plex HRM készülék. A gyártási dátum a készülék hátoldalán található sorozatszámról olvasható le. A sorozatszám formátuma „hhéésszsz”, ahol a „hh” a számjegyekkel jelölt gyártási hónapot jelzi, az „éé” a gyártás évének utolsó két számjegyét jelzi, az „szszsz” pedig egy egyedi készülékazonosító.

-
- QIASure self-collected brush specimen Assay Profile (az AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap fájlból) (ahol az Y legalább 0) az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékmintákból nyert és biszulfid-konvertált DNS-en alapuló alkalmazáshoz

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Csak in vitro diagnosztikai célra.

Biztonsági információk

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheet, SDS) tartalmazznak. Ezek elérhetők online, a www.qiagen.com/safety weboldalon, jól kezelhető, kompakt PDF formátumban; a weboldalon megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az egyes QIAGEN® kitek és a kitben található komponensek biztonsági adatlapja.

QIASURE MASTER MIX



Tartalmazott anyag: 1,2,4-triazol: Vigyázat! Károsíthatja a termékenységet vagy a születendő gyermeket. Védőkesztyű/ védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Általános óvintézkedések

A PCR-tesztek alkalmazásakor be kell tartani a helyes laboratóriumi gyakorlatot, ami magában foglalja a molekuláris biológiai célra készült, valamint a vonatkozó szabályozásoknak és a megfelelő szabványoknak megfelelő berendezések karbantartását.

Mindig tartsa szem előtt az alábbiakat:

- A minták kezelésekor viseljen egyszer használatos, hintőpormentes védőkesztyűt, laboratóriumi köpenyt és védőszemüveget.

- Óvja meg a mintát és a kítet a mikrobiális és nukleáz (DN-áz) szennyeződésektől. A DN-áz a DNS-templát lebomlását idézheti elő.
- Kerülje a DNS, illetve a PCR-termék előző vizsgálati anyaggal történő szennyezését (átszennyezés), mivel az álpozitív jelet eredményezhet.
- Minden esetben használjon DN-áz mentes, aeroszolszűrővel ellátott egyszer használatos pipettahegyeket.
- A QIASure assay reagensei optimális koncentrációra vannak hígítva. Ne hígítsa tovább a reagenseket, mivel az teljesítménycsökkenéshez vezethet.
- A QIASure kitben biztosított reagensek kizárólag az ugyanabban a kitben lévő többi reagenssel együtt használhatók. Ne helyettesítse az egyik kitben lévő reagenst egy másik QIASure kitben lévő ugyanolyan reagenssel, még akkor sem, ha ugyanabból a gyártási tételből származnak, mivel az befolyásolhatja a teljesítményt.
- További figyelmeztetéseket, óvintézkedéseket és eljárásokat a Rotor-Gene Q MDx készülék felhasználói kézikönyvében olvashat.
- Minden nap az első futtatás előtt végezze el a Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM bemelegítő futtatását 95 °C-on, 10 percen keresztül.
- Az inkubációs idők és hőmérsékletek megváltoztatása hibás vagy ellentmondásos adatokat eredményezhet.
- Ne használja a kit lejárt szavatosságú vagy nem megfelelően tárolt összetevőit.
- Minimalizálja az összetevők fényexpozícióját; a reakcióelegyek az expozíció hatására módosulhatnak.
- Különösen ügyeljen arra, hogy az elegyek ne szennyeződjenek a PCR-reagensekben lévő szintetikus anyagokkal.
- A mintákat és az assay során képződő hulladékokat a helyi biztonsági eljárásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Az AssayManager profilokkal kapcsolatos óvintézkedések

A különféle mintatípusokhoz eltérő AssayManager profilokra van szükség. Győződjön meg arról, hogy minden mintatípushoz a megfelelő profilt használja az alábbiak szerint:

- A „QIASure cervical scrapes Assay Profile (az AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap fájlból)” használandó az orvosok által vett méhnyaki mintákból nyert és biszulfít-konvertált DNS teszteléséhez
- A „QIASure self-collected brush specimens Assay Profile (az AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap fájlból)” használandó az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékmintákból nyert és biszulfít-konvertált DNS teszteléséhez

A reagensek tárolása és kezelése

Szállítási körülmények

A QIAure Methylation Test szárazjégen tárolva kerül szállításra. Ha a QIAure Methylation Test valamelyik összetevője az érkezéskor nincs fagyott állapotban, ha a külső csomagolást a tranzit során felbontották, vagy ha a leszállított termékből hiányzik a csomagolási feljegyzés, a kézikönyvek vagy a reagensek, forduljon a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálati részlegéhez vagy a helyi forgalmazóhoz (lásd a kézikönyv hátlapján, vagy látogasson el a www.qiagen.com oldalra).

Tárolási feltételek

A QIAure Methylation Test kitet közvetlenül az átvételt követően állandó hőmérsékletű fagyasztóban -30 és -15 °C között, fénytől védve kell tárolni.

Stabilitás

A megadott tárolási körülmények között tárolva a QIAure Methylation Test a doboz címkéjén jelzett lejárat dátumig stabil.

Felbontást követően a reagensek eredeti csomagolásukban -30 és -15 °C között tárolhatók. Az ismételt felolvasztás és lefagyasztás kerülendő. Legfeljebb 3 fagyasztás/olvasztás ciklusra kerülhet sor.

- Felbontás előtt az összes csövet óvatosan, 10-szer átforgatva keverje fel és centrifugálja.
- Az egyes reagensek lejárat dátuma az adott összetevő címkéjén található. Helyes tárolási körülmények mellett a termék a stabilitási időn belül megőrzi teljesítményét, feltéve, hogy azonos gyártási tételbe tartozó összetevőket használnak.

A minták kezelése és tárolása



Minden mintát potenciálisan fertőző anyagként kell kezelni.

Méhnyakból származó minták

A QIAure kit a méhnyaki mintákból nyert és biszulfít-konvertált genomiális DNS-mintákkal való felhasználásra szolgál. A méhnyaki mintákkal (kaparékok) validált gyűjtőmedium a PreservCyt® gyűjtőmedium és a *Digene* Specimen Transport Medium (STM). A klinikai minták optimális tárolási hőmérséklete a laboratóriumba érkezést követően 2–8 °C. Ilyen tárolási körülmények mellett a PreservCyt gyűjtőmediumban lévő minták 3 hónapig stabilak a DNS-extrakció előtt.

Megjegyzés: Az STM médiumban tárolt méhnyaki minták 2 °C és 30 °C között tarthatók a tesztelést végző laboratóriumba való expressz (egy éjszakás) szállítás során, majd a kézhezvétel után ismételtelen lefagyaszthatók –20 °C-on.

Otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékminták

A QIAure Methylation Test az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékmintákból extrahált és biszulfít-konvertált genomiális DNS-mintákkal való felhasználásra szolgál. Az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékminták szárazon vagy sóoldatban (0,9% m/V NaCl) gyűjthetők és szállíthatók, a laboratóriumba történő érkezést követően pedig PreservCyt gyűjtőmediumban tárolhatók. A PreservCyt gyűjtőmediumban lévő minták 2–8 °C-on vagy szobahőmérsékleten legfeljebb 3 hónapig tárolhatók.

Genomiális DNS-minták

A genomiális DNS extrakciója után a DNS-minták $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ között tárolhatók és szállíthatók legfeljebb 12 hónapig.

Minta-előkészítés

A QIAure Methylation Test validálva lett a méhnyaki mintákból nyert és biszulfít-konvertált genomiális DNS-mintákkal való felhasználásra. A genomiális DNS biszulfít-konverziója végrehajtható i) a mintában lévő DNS előzetes extrakciója és minőség-ellenőrzése után, illetve ii) közvetlenül a méhnyaki mintán. Ajánlásainkat az alábbiakban írjuk le.

- Biszulfít-konverzió a mintában lévő DNS előzetes extrakciója és minőség-ellenőrzése után
Ez a protokoll előírja a DNS extrakcióját és a DNS koncentrációjának meghatározását, majd az eluátumot optimális térfogatú alikvotokra kell osztani, ez után elkezdhető a biszulfít-konverziós protokoll. A protokollt a ZYMO Research EZ DNA Methylation™ kitjével igazolták. A következő módszereket javasoljuk:
 - DNS-extrakció
A szabványos DNS-extrakciós kitek (pl., oszlop- és mágneses gyöngy alapú kitek) kompatibilisek a QIAure Methylation Test teszttel.
 - DNS-koncentráció meghatározása
A DNS biszulfít-konvertálása előtt mérje meg a DNS koncentrációját. A DNS-koncentráció mérésére alkalmas rendszerek a Qubit® Fluorometer, a NanoDrop 3300 Fluorospectrometer (mindkettő a Thermo Fisher Scientific terméke) vagy ezekkel egyenértékű készülékek.
 - A DNS-eluátum alikvotokra osztása
A biszulfít-konverzió esetében a bevitt DNS optimális mennyisége 100 ng és 2 µg közé esik, a javasolt mennyiség a 200 ng. Ha a DNS-koncentráció túl alacsony a biszulfít-konverzióhoz, ismétlje meg a DNS-extrakciót a klinikai minta nagyobb bemeneti térfogatával, vagy eluálja a DNS-t kisebb elúciós térfogattal.

- Az EZ DNA Methylation Kit kittel történő biszulfít-konverziót a gyártói ajánlásoknak megfelelően kell elvégezni.

Megjegyzés: Az EZ DNA Methylation Kit utasításai szerint a minta DNS mennyisége nem haladhatja meg a 2 µg-ot a kellően magas konverziós hatékonyság (> 98%) elérése érdekében.

- Közvetlenül a méhnyaki mintán végzett biszulfít-konverzió

A PreservCyt® Solution gyűjtőműdiumba vett méhnyaki mintán végzett közvetlen biszulfít-konverziót a QIAGEN EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit kijével igazolták. Magas DNS-koncentrációjú minták (1 ng és 2 µg között) esetében az *EpiTect® Fast 96 Bisulfite Conversion Handbook* szerint jártunk el a gyártói ajánlások szerint, kivéve a következő tételeknél:

- A protokoll 1. lépése. Vegye a PreservCyt® gyűjtőműdiomban lévő méhnyaki minta 2,5%-át (tehát 20 ml-ből 500 µl-t) és legalább 3390 x g-n végzett centrifugálással képezzen pelletet. Távolítsa el a felülúszót, és legfeljebb 20 µl PreservCyt gyűjtőműdiomot hagyjon a sejt pelleten. Ezt a sejt pellet mintát használja a biszulfít-konverziós reakcióhoz, és folytassa a gyártói protokoll 2. lépésével.
- Buffer BL: Ne adjon hozzá hordozó RNS-t.
- A biszulfít-konverziós DNS elúciós térfogata 50 µl Buffer EB mintánként.

Általános ajánlások a biszulfít-konverzióhoz

A reagensek beszennyeződésének elkerülése érdekében a biszulfít-konverziós reakciót külön erre a célra fenntartott területen kell végezni, ahol nem végzik a QIAure Master Mix tárolását és adagolását.

A QIAure reakció bemeneti mennyisége 2,5 µl biszulfít-konvertált DNS.

Ha a minta belső minőség-ellenőrzése negatív eredményt ad (tehát az ACTB C_T-értékei > 26,4), akkor a mintából nyert biszulfít-konvertált DNS elégtelen mennyiséget és/vagy minőséget eredményezett, és érvénytelen értékelést kapott. Végezze el az ajánlott lépéseket, melyekkel az érvényes tartományba eső ACTB C_T-értéket kap majd a következő műveletekhez:

- Biszulfít-konverzió a mintában lévő DNS előzetes extrakciója és mennyiségi ellenőrzése után: Ismételje meg a biszulfít-konverziós reakciót magasabb bemeneti minta DNS-mennyiséggel és/vagy ismételje meg a DNS izolálását magasabb bemeneti mennyiségű méhnyaki mintával
- Közvetlenül a méhnyaki mintán végzett biszulfít-konverzió: Ismételje meg a biszulfít-konverziós reakciót a PreservCyt gyűjtőmédiumba vett méhnyaki minta 10%-ával* (tehát 20 ml-ből 2 ml-rel).

A biszulfít-konvertált DNS legfeljebb 24 óráig tárolható 2–8 °C-on, legfeljebb 5 napig –25 és –15 °C között és legfeljebb 3 hónapig –70 °C alatt. Mindenkor kerülni kell a biszulfít-konvertált DNS ismét kiolvasztását és fagyasztását. A megfelelő minőség megőrzése érdekében legfeljebb három fagyasztási/kiolvasztási ciklus megengedhető.

* A közvetlen biszulfít-konverzió mintatérfogata megnövelhető, amennyiben a mintavételi variabilitás, például nem megfelelően végzett mintavétel miatt elégtelen a sikerességi ráta.

Protokoll: QIASure Methylation Test PCR a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM készüléken*

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Az eljárás indítása előtt hagyjon időt arra, hogy megismerje a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM készüléket. Lásd a készülék felhasználói kézikönyvét (katalógusszám: 9002033 vagy 9002032).
- Minden nap az első futtatás előtt végezze el a Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM bemelegítő futtatását 95 °C-on, 10 percen keresztül.
- A Rotor-Gene AssayManager v1.0 lehetővé teszi a PCR eredmények automatikus értelmezését. A QIASure kitet a Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftvert használó Rotor-Gene Q MDx készüléken kell futtatni. Hagyjon időt arra, hogy megismerje a Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftvert (katalógusszám: 9022739) és az Epsilon Plug-In beépülő modul működését, és olvassa mindkét szoftver felhasználói kézikönyvét.
- A különféle mintatípusokhoz eltérő Rotor-Gene AssayManager v1.0 Assay profilokra van szükség. Győződjön meg arról, hogy minden mintatípushoz a megfelelő profilt használja az alábbiak szerint:
 - A „QIASure cervical scrapes Assay Profile (az AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap fájlból)” használandó az orvosok által vett méhnyaki mintákból nyert és biszulfít-konvertált DNS teszteléséhez
 - A „QIASure self-collected brush specimens Assay Profile (az AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap fájlból)” használandó az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékmintákból nyert és biszulfít-konvertált DNS teszteléséhez

* 2010. január vagy annál későbbi gyártási dátumú Rotor-Gene Q 5plex HRM készülék. A gyártási dátum a készülék hátoldalán található sorozatszámról olvasható le. A sorozatszám formátuma „hhéésszsz”, ahol a „hh” a számjegyekkel jelölt gyártási hónapot jelzi, az „éé” a gyártás évének utolsó két számjegyét jelzi, az „szszsz” pedig egy egyedi készülékazonosító.

Megjegyzés: Kísérletenként csak egyetlen típusú mintát szabad tesztelni. Az egyes assay-k profilját a mintatípusokhoz optimalizálták, és elengedhetetlen, hogy az ügyfelek a megfelelő assay-profilat válasszák ki az adott mintatípussal elérhető optimális eredmények érdekében.

Teendők az eljárás megkezdése előtt

- A Rotor-Gene AssayManager v1.0.x szoftververzió (ahol az x értéke legalább 4) legyen telepítve a Rotor-Gene Q MDx készülékhez csatlakoztatott számítógépen. A Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application telepítésére vonatkozó részletes információkat lásd a *Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application felhasználói kézikönyvét*.
- A QIAure Methylation Test egy specifikus beépülő modul, az „Epsilon Plug-in” (1.0.1 vagy újabb verzió) használatát igényli. Ez a beépülő modul a QIAGEN weboldaláról tölthető le: <http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-assaymanager#resources>. Ezt a beépülő modult olyan számítógépre kell telepíteni, amelyen már telepítve van a Rotor-Gene AssayManager 1.0.x verzió (ahol az x értéke legalább 4).
- A QIAure Methylation Test esetében assay-specifikus profilra van szükség, amelyet a Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftverrel együtt kell futtatni. Ez az assay-profil tartalmazza a kísérlet során végzett ciklizáláshoz és a kísérlet elemzéséhez szükséges valamennyi paramétert. 2 QIAure assay profil van:
 - A „QIAure cervical scrapes Assay Profile (az AP_QIAure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap fájlból)” az orvosok által vett méhnyaki mintáknak felel meg
 - A „QIAure self-collected brush specimens Assay Profile (az AP_QIAure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap fájlból)” az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékmintáknak felel meg. A profilok letölthetők a QIAure Methylation Test weboldaláról: <http://www.qiagen.com/Shop/Assay-Technologies/Complete-Assay-Kits/hpv-testing/qiaure-methylation-test-kit-eu/>. Az assay-profil importálni kell a Rotor-Gene AssayManager szoftverbe.

Megjegyzés: A QIASure kit csak akkor futtatható, ha bizonyos konfigurációs beállítások be vannak programozva a Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftverbe. A rendszerszintű folyamatbiztonság érdekében a következő előírt konfigurációs beállításokat kell beállítani a zárt üzemmódhoz:

- „Material number required” (Anyagszám szükséges)
- „Valid expiry date required” (Érvényes lejárat dátum szükséges)
- „Lot number required” (Tételszám szükséges)

Az Epsilon Plug-in beépülő modul telepítése és az assay-profil importálása


Az Epsilon Plug-in beépülő modul telepítésének és az assay-profil importálásának részletes leírását lásd a *Rotor-Gene AssayManager Core Application felhasználói kézikönyvében* és az *Epsilon Plug-In felhasználói kézikönyvében*.

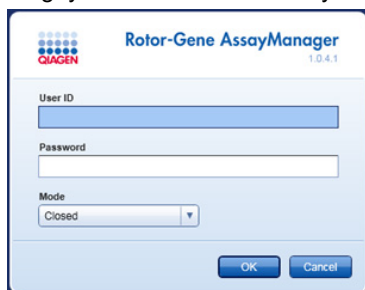
- Töltse le az Epsilon Plug-in beépülő modult és a QIASure assay-profilt a QIAGEN weboldaláról.
- Kattintson duplán az EpsilonPlugin.Installation.msi fájlra a telepítési folyamat elindításához, majd kövesse a telepítési utasításokat. A folyamat részletes leírását lásd az *AssayManager Core Application felhasználói kézikönyvének* „Beépülő modulok telepítése” című fejezetében.

Megjegyzés: A rendszerszintű folyamatbiztonság érdekében válassza a **Settings** (Beállítások) fület, és jelölje be **Material number required (Anyagszám szükséges)**, **Valid expiry date required** (Érvényes lejárat dátum szükséges) és **Lot number required (Tételszám szükséges) jelölőnégyzeteket** a zárt üzemmódhoz (a Work list (Munkalista) részen). Ha nincsenek engedélyezve (bejelölve), kattintson az engedélyezéshez.

- A beépülő modul sikeres telepítés után a Rotor Gene AssayManager szoftverhez rendszergazda jogosultsággal rendelkező felhasználónak kell importálni az AP_QIASure_V1_0_Y.iap assay profilt az alábbiak szerint.

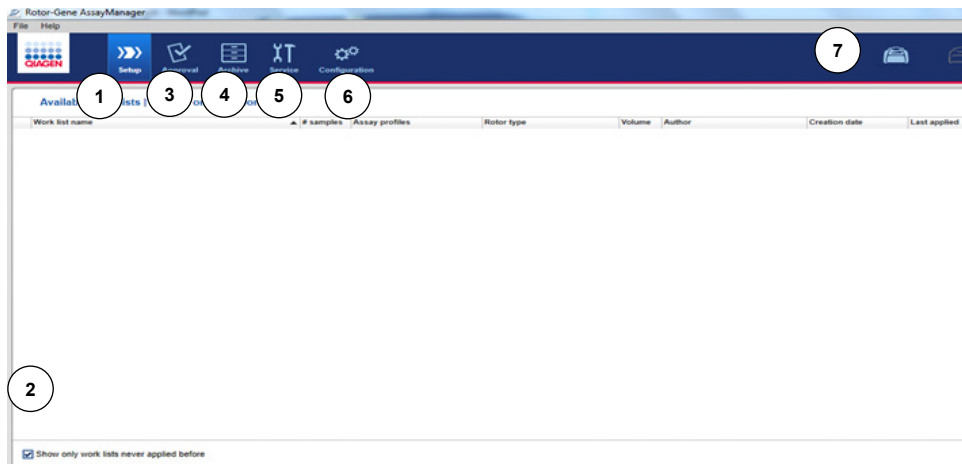


1. Az ikonra kattintva nyissa meg a Rotor-Gene AssayManager szoftvert. 
Megnyílik a Rotor-Gene AssayManager ablak (lásd 1. ábra).



1. ábra: A Rotor-Gene AssayManager bejelentkezési képernyője.

2. Jelentkezzen be a Rotor-Gene AssayManager szoftverbe a felhasználói azonosítójával és jelszavával. Ne változtassa meg a „Closed” (Zárt) üzemmódot. Kattintson az OK gombra. Megnyílik a Rotor-Gene Assay Manager képernyője (lásd alább).



1 Setup (Beállítások) lap. Ezen a lapon kezelhetők vagy alkalmazhatók a munkalisták.

5 Service (Szerviz) lap. Megmutatja a szoftver által létrehozott fájlok eseménynaplóját tartalmazó jelentést

- 2 Az alkalmazott munkalisták jelölőnégyzeteinek bejelölésével csak az új munkalisták jelennek meg.
- 3 Approval (Jóváhagyás) lap. Ezen a lapon kikeresheti a korábbi kísérleteket (futtatásokat).
- 4 **Archive** (Archívum) lap. Kikeresheti a már jóváhagyott korábbi kísérleteket (futtatásokat).

- 6 Configuration (Konfigurálás) lap. Itt konfigurálhatja az összes szoftverparamétert
- 7 Rotor-Gene Q MDx ikonok.



Not connected (Nincs kapcsolat)



Connected (Kapcsolódva)

3. Válassza ki a konfigurációs környezetet.
4. Válassza az **Assay Profiles** (Assay profilok) lapot.
5. Kattintson az Import (Importálás) gombra.
6. A párbeszédpanelen válassza ki az Assay Profile AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap fájlt a méhnyakból származó mintákhoz és/vagy az Assay Profile AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap fájlt az importáláshoz, és kattintson az Open (Megnyitás) gombra.
7. Miután sikeresen importálta az assay-profil, használhatja a „Setup” (Beállítások) környezetben.

Megjegyzés: Egy assay-profil ugyanazon verziója csak egyszer importálható.

Mintafeldolgozás a 72 mintahelyes rotorral rendelkező Rotor-Gene Q MDx készülékeken

A kalibrátoron és a templátot nem tartalmazó kontrollon kívül legfeljebb 70 biszulfít-konvertált DNS-minta vizsgálható ugyanabban a futtatásban (kísérletben). Az 1. táblázatban bemutatott elrendezés példa a betöltő blokk vagy a rotor beállítására a QIASure Methylation Test kittel végzett futtatáshoz. A számok a betöltő blokkban elfoglalt pozíciókat és a végső rotorpozíciókat jelzik.

1. táblázat: Lemez- és rotorbeállítások a Rotor-Gene Q MDx készüléken QIASure kittel végzett futtatáshoz

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



A csöveket az 1. táblázat szerint kell betölteni a rotorba. Az Assay Profile (Assayprofil) lapon beállított automatizált elemzés ezen az elrendezésen alapul. Más elrendezés használata esetén hibás eredményeket fog kapni.

Megjegyzés: Az összes nem használt pozíciót töltsse fel üres csövekkel.

PCR a 72 csöves rotorral rendelkező Rotor-Gene Q MDx készülékeken

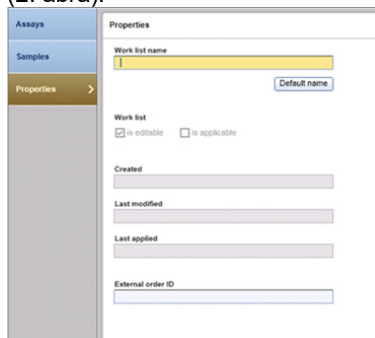
Minden nap az első futtatás előtt végezze el a Rotor-Gene Q MDx 5-plex HRM bemelegítő futtatását 95 °C-on, 10 percen keresztül.

1. Hozzon létre egy munkalistát a feldolgozandó mintához az alábbiak szerint:
 - 1a. Kapcsolja BE a Rotor-Gene Q MDx készüléket.
 - 1b. Nyissa meg a Rotor-Gene AssayManager szoftvert, és a zárt üzemmódban jelentkezzen be kezelői szerepkörű felhasználóként.
 - 1c. Kattintson a New work list (Új munkalista) gombra a munkalista-kezelőben („Setup” (Beállítások) környezet).
 - 1d. Válassza ki a **QIASure assay profile** profilt az elérhető assay-profilok listáján.

Megjegyzés: Az AP_QIASure_CervicalScrape_V1_0_Y.iap assay profil a méhnyaki mintáknak felel meg; az AP_QIASure_SelfCollectedBrush_V1_0_Y.iap assay profil az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékmintáknak felel meg.

Megjegyzés: Kísérletenként csak egyetlen típusú mintát szabad tesztelni.
 - 1e. Kattintson a **Move** (Áthelyezés) gombra a kiválasztott assay-profilnak a Selected assay profiles (Kiválasztott assay-profilok) listára való áthelyezéséhez. Az assay-profilnak most már meg kell jelennie a „Selected assay profiles” (Kiválasztott assay-profilok) listán.
 - 1f. Adja meg a minták számát a megfelelő mezőben.
 - 1g. Adja meg a QIASure kit adatait, amelyek a doboz fedelére vannak nyomtatva.
 - Anyagszám: 1102417
 - Érvényes lejárat dátum ÉÉÉÉ-HH-NN formátumban
 - Tételszám
 - 1h. Válassza a Samples (Minták) lépést. Megjelenik a minta adatait mutató lista az AssayManager képernyőn. Ez a lista a rotor várt elrendezését képviseli.
 - 1i. Vigye be a minta vagy minták azonosítószámát a listára, valamint az opcionális további adatokat az egyes mintákra vonatkozó megjegyzéseként.

- 1j. Válassza a **Properties** (Tulajdonságok) lépést és adja meg a munkalista nevét (2. ábra).



2. ábra: Properties (Tulajdonságok).

- 1k. Ellenőrizze, hogy **be van-e jelölve** a jelölőnégyzet, és kattintson az **Apply** (Alkalmaz) gombra.
- 1l. Mentse el a munkalistát.

A munkalista nyomtatható, ami segíthet a PCR előkészítése és beállítása során. A munkalista nyomtatásához kattintson a Print work list (Munkalista nyomtatása) gombra. A munkalistán megjelennek a minta részletes adatai.

Megjegyzés: A munkalista létrehozható, miután már beállította a futtatást a készüléken, illetve elmenthető, mielőtt hozzáadja a mintákat a készülékhez.

2. Állítsa be a QIAure futtatást.

A PCR-reakció szennyeződési kockázatának minimalizálása érdekében erősen ajánlott az UV-besugárzási funkcióval rendelkező PCR-fülke használata.

A QIAure Master Mix adagolását a DNS biszulfid-konverziós reakció végrehajtásához használt helytől eltérő területen kell elvégezni.

A templát- és nukleáz-szennyeződés megelőzése érdekében a DNS-degradáló oldat használata előtt tisztítsa meg a munkafelületet, a pipettákat és a csőtartó állványt.

Megjegyzés: Az egyes csövek között cseréljen pipettahegyet, hogy elkerülje a nem specifikus templát- vagy reakcióelegy-szennyeződést, ami álpozitív eredményekhez vezethet.

- 2a. Teljesen olvassa ki a QIASure Master Mix keveréket és a QIASure Calibrator kalibrátort, és lehetőség szerint óvja a QIASure Master Mix keveréket a fénytől.
Megjegyzés: Az összetevők lebomlásának elkerülése érdekében ne haladja meg a 30 percet a kiolvasztási lépés során.
 - 2b. 10-szer óvatosan átforgatva keverje össze a cső tartalmát, majd használat előtt centrifugálja rövid ideig.
 - 2c. Adagoljon 17,5 µl használatra kész QIASure Master Mix keveréket a fűzerek megfelelő csöveibe. A reakció előkészítése szobahőmérsékleten végezhető.
 - 2d. Az összetevők lebomlásának elkerülése érdekében tegye vissza a QIASure Master Mix keveréket a fagyasztóba.
 - 2e. Vigye a csöveket egy elkülönített területre az assay kontrollok és a biszulfít-konvertált minták hozzáadásához.
 - 2f. Adjon 2,5 µl vizet a 2. pozícióban lévő, **templátot nem tartalmazó kontrollhoz (No Template Control, NTC)** (lásd 1. táblázat fent). Óvatosan keverje össze fel-le pipettázással.
 - 2g. Adjon 2,5 µl of QIASure Calibrator kalibrátort az 1. pozícióban lévő csőhöz (lásd 1. táblázat fent). Óvatosan keverje össze fel-le pipettázással, majd kupakkal zárja le a csövet.
 - 2h. Adjon 2,5 µl biszulfít-konvertált DNS-t a megfelelő csőbe. Óvatosan keverje össze fel-le pipettázással.
 - 2i. Minden 4 csőből álló csoport megtöltése után zárja le kupakkal a csöveket.
Megjegyzés: A PCR-csövek a minták PCR-csőbe pipettázását követően a vizsgálat elindítása előtt 30 percig tárolhatók a berendezésben 2–8 °C-on, sötétben.
 - 2j. Az összetevők lebomlásának elkerülése érdekében tegye vissza a QIASure Calibrator kalibrátort a fagyasztóba.
Megjegyzés: Az egyes csövek között cseréljen pipettahegyet, hogy elkerülje a nem specifikus templát- vagy reakcióelegy-szennyeződést, ami álpozitív eredményekhez vezethet.
3. Készítse elő a Rotor-Gene Q MDx készüléket, és az alábbiak szerint indítsa el a futtatást (kísérletet):

- 3a. Helyezzen egy 72 cellás rotort a rotortartóba.
 - 3b. Töltse fel a rotort csőfüzérékkel a kijelölt pozícióknak megfelelően az 1. táblázatban bemutatottak szerint, az 1. pozícióval kezdve, és az összes nem használt pozícióba helyezzen üres, kupakkal ellátott csőfüzéréket.
Megjegyzés: Ügyeljen rá, hogy az első cső az 1-es pozícióba kerüljön, és a csőfüzerek helyes irányban, a megfelelő pozíciókban helyezkedjenek el, az 1. táblázatban közölteknek megfelelően.
 - 3c. Helyezze fel a zárógyűrűt.
 - 3d. Töltse be a rotort a zárógyűrűvel együtt a Rotor-Gene Q MDx készülékbe, és zárja le a készülék fedelét.
 - 3e. A Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftverben válassza ki a megfelelő munkalistát a munkalista kezelőben és kattintson az **Apply** (Alkalmaz) gombra, vagy ha a munkalista még nyitva van, kattintson az **Apply** (Alkalmaz) gombra.
Megjegyzés: Ha még nem hozták létre a futtatás munkalistáját, jelentkezzen be a Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftverbe, és a továbblépés előtt végezze el az 1. lépést.
 - 3f. Adja meg a futtatás (kísérlet) nevét.
 - 3g. A Cyclor selection (Ciklus kiválasztása) lista segítségével válassza ki a használni kívánt ciklust.
 - 3h. Ellenőrizze a zárógyűrű megfelelő csatlakoztatását, és erősítse meg a képernyőn, hogy csatlakoztatva van a zárógyűrű.
 - 3i. Kattintson a **Start experiment** (Kísérlet indítása) gombra.
Ekkor elindul a QIAure Methylation Test futtatás.
4. A futtatás végén kattintson a Finish run (Futtatás befejezése) gombra.
 5. Adja ki és hagyja jóvá a futtatást.
 - Az Approver (Jóváhagyó) felhasználói szerepkörrel bejelentkezett felhasználók kattintsanak a Release and go to approval (Kiadás és jóváhagyás) gombra.
 - Az Operator (Kezelő) felhasználói szerepkörrel bejelentkezett felhasználók kattintsanak a **Release** (Kiadás) gombra.

6. Adja ki az eredményeket.

- Ha a felhasználó a Release and go to approval (Kiadás és jóváhagyás) gombra kattintott, megjelennek a kísérlet eredményei.
- Ha Operator (Kezelő) szerepkörrel rendelkező felhasználó a Release (Kiadás) gombra kattintott, egy „Approver” (Jóváhagyó) felhasználói szerepkörrel rendelkező felhasználó jelentkezzen be és válassza az „Approval” (Jóváhagyás) környezetet.
- Az assay szűréséhez válassza ki a kívánt szűrési opciót, majd kattintson az Apply (Alkalmaz) gombra.
- Tekintse át az eredményeket és hagyja jóvá az egyes tesztminták eredményeit.

A „Results” (Eredmények) táblázatban görgessen a jóváhagyni kívánt mintához.

Minden, a jóváhagyandó minták eredményét tartalmazó különálló sor végén három választógomb van.

Válassza az **Accept** (Elfogad) vagy a **Reject** (Elutasít) lehetőséget az egyes minták eredményeinél.

Megjegyzés: A Rotor-Gene AssayManager által automatikusan INVALID (Érvénytelen) minősítésre beállított eredmények nem állíthatók át érvényes eredményekké, még az eredmény elvetése esetén sem.

Opcionális: Adjon meg egy megjegyzést a Sample comment (Mintához adott megjegyzés) oszlopban.

- Kattintson a Release/Report data (Adatok kiadása/leletezése) lehetőségre.
- Kattintson az OK gombra. A lelet Adobe hordozható dokumentumformátumban (.pdf) készül és a szoftver automatikusan egy előre meghatározott mappában tárolja. A mappa alapértelmezett elérési útvonala: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Exportálás) > Reports (Jelentések)

Megjegyzés: Az útvonal és a mappa a „Configuration” (Konfigurálás) környezetben módosítható.

- Az Archive (Archívum) lapon exportálhatja a nyers adatoknak megfelelő .rex fájlt. A szűrési opciók segítségével keresse meg a kívánt kísérletet, és kattintson a Show

assays (Assay-k megmutatása) lehetőségre. Utána kattintson az Export .rex file (.rex fájl exportálása) gombra, és az **OK** gombra kattintva mentse a fájlt. A szoftver automatikusan az előre meghatározott mappába menti a .rex fájlt: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export** (Exportálás) > **Experiments** (Kísérletek)

Megjegyzés: Az útvonal és a mappa a Specify the .rex file export destination (A .rex fájl exportálási célmappájának megadása) lapon módosítható.

Megjegyzés: A hibaelhárításhoz a futtatásból készített támogatási csomagra van szükség. A támogatási csomagok a jóváhagyási vagy az archiválási környezetben hozhatók létre. Lásd *Rotor-Gene AssayManager Core Application felhasználói kézikönyv*, Hibaelhárítás, „Támogatási csomag létrehozása” a <https://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-assaymanager#resources> oldalon. További segítséget nyújthat az esemény napja ± 1 nap alatt rögzített eseménynapló. Az eseménynapló a Service (Szerviz) környezetben kérhető le (*Rotor-Gene AssayManager Core Application felhasználói kézikönyv*).

7. Ürítse ki a Rotor-Gene Q MDx készüléket, és ártalmatlanítsa a csőfűzéseket a helyi biztonsági szabályozásoknak megfelelően.

Az eredmények értelmezése

Az elemzés teljesen automatizált.

A Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftver először az amplifikációs görbéket elemzi, és a görbék alakjától és zajamplitúdójától függően érvénytelenítheti a nem megfelelő görbéket. Ilyen esetben a szoftver egy jelölést ad az érvénytelenített görbéhez (lásd 2. táblázat).

Ezt követően a Rotor-Gene AssayManager v1.0 elemzi a futtatás kontrolljait.

- Kalibrátor
- NTC

Megjegyzés: A futtatás végén létrehozott jelentés megjeleníti a futtatási kontrollok eredményeit, ahol az érvénytelen adatok előtt érvénytelenítő jelölések vannak.

Ha a futtatás minden kontrollja megfelelő, akkor a Rotor-Gene AssayManager elvégzi az ismeretlen minták elemzését.

A 2. táblázat mutatja azokat az érvénytelenítő mintajelöléseket, amelyeket a Rotor-Gene AssayManager v1.0 az elemzés során hozzáadhat az egyes csövekhez, valamint az egyes jelölések magyarázatát.

2. táblázat: Érvénytelenítő mintajelölések bemutatása

Jelölés	Értelmezés	Leírás
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Érvénytelen	A célérték meghaladja a meghatározott tartományt. Ez lehet C_T , végponti fluoreszcencia, koncentráció vagy számított érték, pl. átlag C_T vagy ΔC_T .
ASSAY_INVALID	Érvénytelen	Az assay érvénytelen, mert legalább egy külső kontroll érvénytelen.
BELOW_ACCEPTED_RANGE	Érvénytelen	A célérték a meghatározott tartomány alatt van. Ez lehet C_T , végponti fluoreszcencia, koncentráció vagy számított érték, pl. átlag C_T vagy ΔC_T .
CONSECUTIVE_FAULT	Érvénytelen	A célérték számításához használt célérték érvénytelen.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Érvénytelen	A nyersadatok amplifikációs görbéjének alakja eltér az assay által produkált jellemző görbétől. Nagy az esélye a hibás eredményeknek vagy valamelyik eredmény hibás értelmezésének.
FLAT_BUMP	Érvénytelen	A nyersadatok amplifikációs görbéje lapos harang alakú, ami eltér az assay által produkált jellemző görbétől. Nagy az esélye a hibás eredményeknek vagy az eredmények hibás értelmezésének (pl. A C_T -érték hibás meghatározásának).
IN_ACCEPTED_RANGE	Érvényes	Az NTC kontroll 36-ot meghaladó jel C_T -értékeket mutat az ACTB célszekvencia esetében.
INVALID_CALCULATION	Érvénytelen	Sikertelen volt a számítás az adott célszekvencia esetében.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Érvénytelen	Az amplifikációs görbe egynél többször keresztezi a küszöbértéket. A C_T -érték nem határozható meg egyértelműen.
NO_BASELINE	Érvénytelen	Nincs kiindulási érték a kezdeti alapvonalhoz.
NO_CT_DETECTED	Változó	Ehhez a célszekvenciához nem határozható meg C_T -érték.
NO_VALUE	Érvénytelen	A várakozás ellenére a célszekvencia nem ad értéket. Az értéknek nem kell egy bizonyos tartományba esnie. Ez lehet C_T , végponti fluoreszcencia, koncentráció vagy számított érték (pl. átlag C_T vagy ΔC_T).
NORM_FACTOR_ALTERATION	Figyelmeztetés	Eltérés a normalizációs eljárás során. Az amplifikációs görbe alapértelmezett normalizációval jelenik meg; az eredményeket a helyesség érdekében manuálisan ellenőrizni kell.
OTHER_TARGET_INVALID	Érvénytelen	Egy másik célszekvencia ugyanazon minta esetében érvénytelen.

SATURATION	Érvénytelen	A nyersadatok fluoreszcenciája erős telítettséget mutat még az amplifikációs görbe inflexióis pontja előtt.
SATURATION_IN_PLATEAU	Figyelmeztetés	A nyersadatok fluoreszcenciája telítettséget mutat az amplifikációs görbe plató fázisában.
SPIKE	Figyelmeztetés	Az amplifikációs görbe valamely részén a nyersadatok fluoreszcenciájában megjelenik egy csúcs, de nem ott, ahol a C_T -érték meghatározása történik.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Érvénytelen	A csúcs helye az amplifikációs görbén közel van a C_T -értékhez.
STEEP_BASELINE	Érvénytelen	Az amplifikációs görbén a nyersadatok fluoreszcenciájának alapvonala meredek emelkedést mutat.
STRONG_BASELINE_DIP	Érvénytelen	Az amplifikációs görbén a nyersadatok fluoreszcenciájának alapvonala erős csökkenést mutat.
STRONG_NOISE	Érvénytelen	Erős zaj észlelhető az amplifikációs görbe növekedési fázisán kívül.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Érvénytelen	Erős zaj észlelhető az amplifikációs görbe növekedési (exponenciális) fázisában.
UNCERTAIN	Változó	Az AUDAS eredményei ellentmondanak az alapelemzés eredményeinek. Az adatok érvényességének egyértelmű automatikus felmérése nem lehetséges.
UNEXPECTED_CT_DETECTED	Változó	C_T -érték észlelhető egy célszekvenciánál, amelynél nem várható amplifikáció.
UNEXPECTED_VALUE	Érvénytelen	A célszekvencia értéket ad, de nem a várt értéket. Ez lehet C_T , végponti fluoreszcencia, koncentráció vagy számított érték, pl. átlag C_T vagy ΔC_T .
UPSTREAM	Változó	A minta állapotát valamelyik upstream folyamat (pl., QIASymphony) Invalid (Érvénytelen) vagy Unclear (Nem egyértelmű) értékre állította. Megjegyzés: A nem egyértelműként megjelölt minták esetében a Rotor-Gene AssayManager viselkedését az AssayManager szoftver „Configuration” (Konfigurálás) környezete határozza meg. Az upstream folyamatokból származó „Invalid” (Érvénytelen) jelölések eredményeképpen a Rotor-Gene AssayManager az adott mintát érvénytelenként jelöli meg.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Érvénytelen	Az amplifikációs görbén a nyersadatok fluoreszcenciájában hullámos alapvonal észlelhető.

- Ha a futtatás minden kontrollja érvényes, akkor a Rotor-Gene AssayManager v1.0 elvégzi az ismeretlen minták elemzését. Egy minimális mennyiségű biszulfít-konvertált DNS-nek jelen kell lenni a mintában ahhoz, hogy az eredmény értelmezhető legyen. Ezt jelzi az ACTB háztartási gén C_T -értéke, amelynek $\leq 26,4$ értékűnek kell lennie ahhoz, hogy a Rotor-Gene AssayManager validálja.
- Ezt követően a szoftver kiszámítja a *FAM19A4* és a *hsa-mir124-2* gén $\Delta\Delta C_T$ -értékét, és megadja az eredményt. Ha a $\Delta\Delta C_T$ -érték a küszöbérték alatt van, akkor a célgén „Hypermethylation positive” (Hipermetiláció-pozitív) értékelést kap.

Megjegyzés: A részleges vagy alacsony szintű metiláció természetes jelenség, amely a hipermetilációval ellentétben nincs közvetlenül kapcsolatban a rákbetegség kialakulásával.

- A minta „Hypermethylation positive” (Hipermetiláció-pozitív) eredményűnek tekinthető, ha legalább egy célgén értékelése „Hypermethylation positive” (Hipermetiláció-pozitív).

Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. A QIAGEN műszaki szolgálat kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a mintafeldolgozási és assay módszerekkel kapcsolatban (az elérhetőség a kézikönyv hátlapján vagy a következő címen található: **www.qiagen.com**).

A Rotor-Gene AssayManager alkalmazással kapcsolatos hibaelhárítási információkat lásd a *Rotor-Gene AssayManager Core Application felhasználói kézikönyvében*.

Megjegyzések és javaslatok

Általános kezelés

A minta DNS-koncentrációja túl alacsony a biszulfít-konverzióhoz

Ellenőrizze a DNS-extraktumot	Ismételje meg a DNS-extrakciót magasabb koncentrációjú klinikai mintával
-------------------------------	--

A minta érvénytelen értékelést kapott: Az ACTB-amplifikáció túlságosan alacsony vagy nem történt meg

- | | |
|---|--|
| a) Pipettázási hiba vagy kihagyott reagensek | Ellenőrizze a pipettázási sémát és a reakcióbeállításokat. Ismétlje meg a PCR-futtatást. |
| b) Ellenőrizze a DNS-koncentrátumot | Növelje maximálisra a biszulfít-konverziós reakcióba bevitt DNS mennyiségét. A biszulfít-konverzió a 100 ng és 2 µg közötti bemeneti DNS-mennyiség tartományában mutat optimális teljesítményt |
| c) A „Bisulfite-conversion directly on cervical specimen” (Közvetlenül a méhnyaki mintán végzett biszulfít-konverzió) protokoll esetében ellenőrizze a klinikai minta sejttartalmát | Ismételje meg a biszulfít-konverziós reakciót a PreservCyt gyűjtőműdiumba vett méhnyaki minta 10%-ával (tehát 20 ml-ből 2 ml-rel). |
| d) Ellenőrizze a biszulfít-konvertált eluátumot | Ismételje meg a biszulfít-konverziót, és szükség esetén használjon nagyobb bemeneti DNS mennyiséget. |

A minta érvénytelen értékelést kapott: a *FAM19A4* és/vagy a *hsa-mir124-2* célszekvencia érvénytelen

Elégtelen összekeverés	Pipetázással keverje össze a mintát és a reakcióelegyet (csőenként körülbelül 10-szer pipetázza fel-le). Ismétlje meg a minta vizsgálatát.
------------------------	--

A pozitív kontroll érvénytelen értékelést kapott: az amplifikáció túlságosan alacsony vagy nem történt meg egy vagy több célszekvencia esetén

- | | |
|---|---|
| a) Pipettázási hiba vagy kihagyott reagensek | Ellenőrizze a pipettázási sémát és a reakcióbeállításokat. Ismétlje meg a PCR-futtatást. |
| b) Részleges lebomlás | A kit összetevőit –30 és –15 °C között tárolja. Legfeljebb három lefagyasztási és felolvasztási ciklust végezzen. |
| c) A PCR-reagensek részleges lebomlása | A kit összetevőit –30 és –15 °C között, a reakcióelegyeket pedig fénytől védve tárolja. Kerülje az ismétlődő lefagyasztást és felolvasztást. |
| d) A csőfűző megfordulása | Ellenőrizze a pipettázási sémát és a reakcióbeállításokat. |
| e) Lejárat dátum | Ellenőrizze az alkalmazott kit lejárati dátumát. |
| f) Időbeli késlekedés a minták pipetázása és a futtatás elindítása között | A PCR reakciókeverékek sötétben, 2–8 °C-on 30 percig tárolhatók a PCR reakcióba történő minta-bemérés és a futtatáshoz használt készülék elindítása között. |

A templátot nem tartalmazó kontroll (NTC) érvénytelen

- | | |
|---------------------|--|
| a) Pipettázási hiba | Ellenőrizze a pipettázási sémát és a reakcióbeállításokat. Ismétlje meg a PCR-futtatást. |
|---------------------|--|

Megjegyzések és javaslatok

- | | | |
|----|---|--|
| b) | Keresztszennyeződés | Cserélje ki az összes kritikus reagenst.
Az átszennyezés megelőzése érdekében minden esetben az általánosan elfogadott gyakorlatoknak megfelelően kezelje a mintákat, a kit összetevőit és a fogyóeszközöket. |
| c) | Reagensek szennyeződése | Cserélje ki az összes kritikus reagenst.
Az átszennyezés megelőzése érdekében minden esetben az általánosan elfogadott gyakorlatoknak megfelelően kezelje a mintákat, a kit összetevőit és a fogyóeszközöket. |
| d) | A csőfűzér megfordulása | Ellenőrizze a pipettázási sémát és a reakcióbeállításokat. |
| e) | Időbeli késlekedés a minták pipettázása és a futtatás elindítása között | A PCR reakciókeverékek sötétben, 2–8 °C-on 30 percig tárolhatók a PCR reakciókba történő mintabemérés és a futtatáshoz használt készülék elindítása között. |
| f) | A próba lebomlása | A reakcióelegyeket fénytől védve tárolja.
Ellenőrizze a hamis pozitív eredményt a fluoreszcenciagörbén. |

A minta nem ad jelet vagy gyenge jelet ad, de a kontroll futtatása rendben van

- | | | |
|----|------------------|--|
| a) | Gátló hatások | Mindig győződjön meg róla, hogy nincs visszamaradt puffer a biszulfít-konverzió alatt végzett centrifugálás után.
Ismételje meg a biszulfít-konverziót. |
| b) | Pipettázási hiba | Ellenőrizze a pipettázási sémát és a reakcióbeállításokat. Ismételje meg a PCR-futtatást. |

Ha a hiba továbbra is fennáll, forduljon a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatához.

Korlátozások

A QIAure Methylation Test reagensei kizárólag in vitro diagnosztikai célra használhatók.

A PCR-tesztek alkalmazásakor be kell tartani a helyes laboratóriumi gyakorlatot, ami magában foglalja a molekuláris biológiai célra készült, valamint a vonatkozó szabályozásoknak és a megfelelő szabványoknak megfelelő berendezések karbantartását.

Validálták a kítchez biztosított reagensek és utasítások optimális teljesítményét.

A QIAure Methylation Test kítet a Rotor-Gene Q MDx készülékek és a Rotor-Gene AssayManager v1.0 szoftver kezelésében képzett laboratóriumi szakemberek használhatják.

Ezt a terméket kizárólag olyan személy használhatja, aki képzett és gyakorlott a real-time PCR és az in vitro diagnosztikai eljárások területén. A kapott diagnosztikai eredményeket mindig az egyéb klinikai vagy laboratóriumi leletekkel összefüggésben kell értelmezni.

Az optimális PCR-eredmények eléréséhez pontosan be kell tartani a felhasználói kézikönyvben (kézikönyvben) leírtakat.

Figyeljen oda a dobozon és az egyes összetevők címkéjén feltüntetett lejárati időkre. Ne használjon lejárt reagenst.

A rossz minőségű vagy alacsony mennyiségű DNS-t tartalmazó minták (pl. az éppen csak a megfelelőségi kritériumokon belül eső ACTB C_T-értékek; 25 és 26,4 közötti C_T-értékek) álnegatív értékelést kaphatnak. Egyenkénti ismételt tesztelés javasolt. Ha az ismételt teszt negatív eredményt ad, akkor a minta hipermetiláció-negatív, a pozitív eredményt pedig azt jelenti, hogy a minta hipermetiláció-pozitív.

A QIAure Methylation Test kitben biztosított reagensek kizárólag az ugyanabban a kitben lévő többi reagenssel együtt használhatók. Máskülönbefolyásolhatják a teljesítményt.

A QIAure Methylation Test HPV-pozitív nőkre validált.

A QIAure Methylation Test validált a PreservCyt vagy az STM gyűjtőmédiumba vett és tárolt méhnyaki mintákra és az otthoni mintavétellel sóoldatba (0,9% m/V NaCl) vett hüvelyi kaparékmintákra. A QIAure Methylation Test nem validált a formaldehidet tartalmazó gyűjtőmédiumba (pl. BD® Surepath® vagy egyenértékű) vett és tárolt méhnyaki mintákkal való használatra. A formaldehid hatására kialakuló keresztkötések zavarhatják a QIAure Methylation Test teljesítményét.

Kizárólag a Rotor-Gene Q MDx készülék validált a QIAure Methylation Test PCR assay-vel való használatra.

A termék nem előírászerű alkalmazása és/vagy az összetevők módosítása semmissé teszi a Self-screen B.V. felelősségét.

A felhasználó felelőssége, hogy validálja a rendszer teljesítményét az adott laboratóriumban alkalmazott bármely olyan eljárásra, amely nem része a Self-screen teljesítményértékelő vizsgálatoknak.

Teljesítményjellemzők

Kimutatási határ (LOD)

A QIAure Methylation Test analitikai szenzitivitását a kimutatási határ 95%-aként (95% LOD) határozták meg a mindhárom amplikonszekvenciát (*ACTB*, *FAM19A4* és *hsa-mir124-2*; tartomány: 750 000 és 0,25 kópia között PCR-enként) tartalmazó plazmid sorozathígításos vizsgálatával. A célszekvenciák LOD-értékének 95%-át vették azon legalacsonyabb plazmid hígításként, amely 36 eset közül 35 esetben pozitív eredményt adott ($C_T < 40$). Összességében négy különböző kezelő 12 kísérletet végzett (naponként és kezelőnként 1 futtatás) három különböző tétellel és három különböző RGQ rendszeren. Mindegyik kísérletben 11 plazmid hígítást mértek három példányban. Az LOD-érték 95%-a mindhárom különböző célszekvencia esetében 7,5 kópia volt PCR-enként.

Linearitás

A QIAure assay linearitását az LOD-érték 95%-ának meghatározására végzett 12 kísérlet adataiból határozták meg. A két célszekvencia, a *FAM19A4* és a *hsa-mir124-2*, valamint a referencia *ACTB* lineáris amplifikációt mutat 7,5 kópia per PCR és 750 000 kópia per PCR között.

Precizitás

A QIAure Methylation Test precizitását az assay-k közötti variabilitásként (egyazon kísérletben azonos koncentrációban alkalmazott minták több eredményének variabilitása) és az assay összes varianciájaként (különböző kezelők által, különböző készülékeken, különböző tételekkel, különböző laboratóriumokban nyert több eredmény variabilitása) határozták meg. A tesztelést a *FAM19A4* és a *hsa-mir124-2* célszekvenciák esetében egyaránt hozzávetőleg 3x LOD koncentrációnak megfelelő jelet mutató, hipermetiláció-pozitív eredményt adó, magas kockázatú, HPV-pozitív méhnyaki mintákból nyert, biszulfít-konvertált DNS-sel végezték.

A tesztelést négy különböző kezelő, 8 futtatásban, két példányban (naponta és kezelőnként egy futtatás) végezték két különböző tétellel és három különböző RGQ készüléken, két különböző laboratóriumban, ami mintánként 16 adatpontot eredményezett. Meghatározták a C_T - és a $\Delta\Delta C_T$ -értékek variációs koefficiensét (CV) (3. táblázat).

3. táblázat: A C_T - és a $\Delta\Delta C_T$ -értékek variációs koefficiense (CV%) metiláció-pozitív méhnyaki mintában

	Minta típusa	Assay-k közötti variabilitás	Assay teljes variációjára
C_T -érték	Minta belső minőség-ellenőrzése (vagyis ACTB)	0,3%	1,32%
	<i>FAM19A4</i>	1,02%	1,52%
	<i>hsa-mir124-2</i>	1,16%	1,64%
$\Delta\Delta C_T$ -érték	<i>FAM19A4</i>	3,70%	5,97%
	<i>hsa-mir124-2</i>	4,21%	5,75%

A fent megadott koncentrációjú adott minta C_T -értékeinek átlagos statisztikai eloszlása 1,32% volt a minta belső minőség-ellenőrzési kontrollja (ACTB), illetve 1,52% a *FAM19A4* és 1,64% a *hsa-mir124-2* esetében. A fent megadott koncentrációjú adott minta $\Delta\Delta C_T$ -értékeinek átlagos statisztikai eloszlása 5,97% volt a *FAM19A4* és 5,75% a *hsa-mir124-2* esetében.

Zavaró anyagok

A PCR-re kifejttet esetleges hatásuk alapján kiválasztott gátló anyagok a biszulfít-konverziós kitben található deszulfonáló és mosópufferek voltak. Az eredeti mintában esetlegesen jelen lévő anyagokat nem tesztelték, mivel a minta DNS-ét kétszer is tisztítják szilícium-dioxid gyöngyökkel, az eredeti minta DNS-extrakciója és a biszulfít-konverziót követő DNS-tisztítás során. A nyomokban jelen lévő deszulfonáló és mosópufferek zavarták a PCR-t, amit a minta belső minőség-ellenőrzésének érvénytelen eredménye jelzett.

Klinikai teljesítmény

HPV-pozitív méhnyaki minták*

A QIAure Methylation Test kit 3-as stádiumú cervicális intraepithelialis neoplasiára (CIN 3) és méhnyakrákra (vagyis CIN 3+) vonatkozó klinikai teljesítményét 267, (18–85 éves korú) nőtől vett, magas kockázatú, HPV-pozitív méhnyaki mintán** tesztelték. Kilenc minta (3,4%) 26,4 fölötti ACTB C_T-értéket adott, ezeket érvénytelenként értékelték. Az érvényes teszteredményt adó 258 minta közül 117 méhnyaki minta olyan nőktől származott, akiknél 18 hónapos utánkövetés során nem találták CIN 2 vagy súlyosabb állapot bizonyítékát (rövidítve: ≤ CIN 1), 42 minta CIN 2 és 30 minta CIN 3 eredményt adott, 59 mintában laphámsejtes karcinómát, 10 mintában adenokarcinómát azonosítottak. A méhnyaki mintákat PreservCyt (Hologic) gyűjtőmédiumba vették. A méhnyaki mintákkal DNS-extrakciót végeztek, és mintánként 250 ng DNS-t vittek be a biszulfid-konverziós reakcióba (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). A 250 ng módosított DNS 20%-át használták a PCR-hez (ez PCR-enként 50 ng eredeti cél DNS-nek felel meg). A QIAure Methylation Test pozitivitási arányait az alább megadott klinikai végpontok szerint rétegezték (4. táblázat).

4. táblázat: A QIAure Methylation Test pozitivitási arányai

Klinikai végpont	Frakció	Pozitivitási arány (95%-os CI)
≤ 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)
Laphámsejtes karcinóma	59/59	100,0% (94,0–100,0)
Adenokarcinóma	10/10	100,0% (69,0–100,0)

A magas kockázatú, HPV-pozitív méhnyaki minták között a CIN 3+ iránti szenzitivitás 89,9% (89/99; 95% CI: 82,2–94,5), a karcinóma iránti szenzitivitás 100% (69/69, 95% CI: 94–100) volt.†

* Orvosok által vett méhnyaki minták.

† Megjegyzés: A mintavétel variabilitása, például nem megfelelő mintavétel miatt nem feltétlenül kerül kimutatásra az előrehaladott CIN lézióval és/vagy méhnyakrákkal rendelkező nők mintáiban lévő célszekvenciák hipermetilációja.

Otthoni mintavétellel vett, HPV-pozitív hüvelyi kaparékminták

Az otthoni mintavétellel vett hüvelyi kaparékminták esetében a QIAure Methylation Test 3-as stádiumú cervicális intraepithelialis neoplasiára és méhnyakrákra (vagyis CIN 3+) vonatkozó klinikai teljesítményét 247, magas kockázatú, HPV-pozitív hüvelyi mintán értékelték. 14 minta (5,7%) > 26,4 ACTB C_T-értéket adott és ezeket érvénytelenként értékelték. Az érvényes teszteredményt adó minták közül 148, otthoni mintavétellel vett kaparék minta olyan nőktől származott, akiknél 18 hónapos utánkövetés során ≤ CIN 1 állapotot mutattak ki, 24 minta CIN 2 és 50 minta CIN 3 eredményt adott, 8 mintában laphámsejtes karcinómát, 3 mintában adenokarcinómát azonosítottak. A hüvelyi mintákkal DNS-extrakciót végeztek, és mintánként 250 ng DNS-t vittek be a biszulfid-konverziós reakcióba (EZ DNA Methylation Kit, ZYMO Research). A 250 ng biszulfid-konvertált DNS 20%-át használták a PCR-hez (ez PCR-enként 50 ng eredeti cél DNS-nek felel meg). A QIAure Methylation Test pozitívítási arányait az alább megadott klinikai végpontok szerint rétegezték (5. táblázat).

5. táblázat: A QIAure Methylation Test pozitívítási arányai

Klinikai végpont	Frakció	Pozitívítási arány (95%-os CI)
≤ CIN 1	34/148	23,0% (16,9–30,4)
CIN 2	7/24	29,2% (14,6–49,8)
CIN 3	33/50	66,0% (52,0–77,7)
Laphámsejtes karcinóma	8/8	100,0% (63,1–100,0)
Adenokarcinóma	3/3	100,0% (29,2–100,0)

A magas kockázatú, HPV-pozitív otthon levett hüvelyi kaparékminták között a CIN 3+ iránti szenzitivitás 72,1% (44/61; 95% CI: 59,7–81,9), a karcinóma iránti szenzitivitás 100% (11/11, 95% CI: 72–100) volt.*

* Megjegyzés: A mintavétel variabilitása, például nem megfelelő mintavétel miatt nem feltétlenül kerül kimutatásra az előrehaladott CIN lézióval és/vagy méhnyakrákkal rendelkező nők mintáiban lévő célszekvenciák hipermetilációja.

A *FAM19A4* és a *hsa-mir124-2* teljesítménye az előrehaladott, transzformálódó CIN léziók kimutatásában

A gazdasejt promóter metiláció elemzése specifikusan kimutatja az úgynevezett „előrehaladott” CIN léziókat, amelyek rákbetegségekre jellemző metilációs profilt mutatnak, és amelyeknél rövid távon várhatóan magas a rákbetegséghez vezető progresszió kockázata (7, 8). A *FAM19A4* és a *hsa-mir124-2* promóter metiláció elemzés teljesítményét 29, előrehaladott, transzformálódó CIN 2/3 lézióval rendelkező nőtől vett magas kockázatú, HPV-pozitív mintán és 19, korai, transzformálódó CIN 2/3 lézióval rendelkező nőtől vett magas kockázatú, HPV-pozitív mintán értékelték. Szoros összefüggés volt a metiláció és az előrehaladott betegség között, minden előrehaladott CIN2/3 léziót (100%; 29/29; 95% CI: 88–100) hipermetiláció-pozitívnak értékelték, míg ez az arány 47% (9/19; 95% CI: 27–69) volt a CIN 2/3 léziók esetében.

Robusztusság

A QIASure Methylation Test robusztusságát a QIASure Methylation Test és az assay kizárólag kutatási célra (Research Use Only, RUO) szolgáló verziója által nyújtott eredmények egyezése alapján határozták meg. A tesztelést 10, magas kockázatú, HPV-pozitív méhnyaki mintából nyert, biszulfid-konvertált genomiális DNS-sel végezték, ebből korábban már 5 mintát mindkét markerre vonatkozóan hipermetiláció-negatívként, 5 mintát pedig (pl. a 2 marker közül legalább egyre vonatkozóan) hipermetiláció-pozitívként azonosítottak. A tesztelést négy különböző kezelő, 8 futtatásban, két példányban (naponta és kezelőnként egy futtatás) végezték két különböző tétellel és három különböző Rotor-Gene Q MDx készüléken, két különböző laboratóriumban. Ezáltal mintánként összesen 16 adatpontot nyertek (6. táblázat).

6. táblázat: A QIASure Methylation Test és az assay RUO verziója közötti egyezés

Mintaszám	RUO eredmény	1. laboratórium, egyezés az RUO verzióval	2. laboratórium, egyezés az RUO verzióval
1	Negatív	100% (8/8)	100% (8/8)
2	Negatív	100% (8/8)	100% (8/8)
3	Negatív	62,5% (5/8)	62,5% (5/8)
4	Negatív	100% (8/8)	100% (8/8)
5	Negatív	100% (8/8)	100% (8/8)
Negatív összesen		92,5% (37/40)	92,5% (37/40)
6	Pozitív	100% (8/8)	100% (8/8)
7	Pozitív	100% (8/8)	100% (8/8)
8	Pozitív	100% (8/8)	100% (8/8)
9	Pozitív	100% (8/8)	100% (8/8)
10	Pozitív	100% (8/8)	100% (8/8)
Pozitív összesen		100% (40/40)	100% (40/40)
Összesen (pozitív és negatív)		96,25% (77/80)	96,25% (77/80)

A korábban metiláció-negatívként azonosított öt minta közül négy 100% egyezést mutatott, amikor mindkét laboratóriumban a QIASure Methylation Test kitet használták. A 3. minta mindkét laboratóriumban 62,5% (5/8) egyezést mutatott. A megfigyelt variáció a *FAM19A4* génhez köthető, és a szint az assay küszöbértékének közelében volt. A metiláció-negatív minták általános egyezése 92,5% (37/40) volt.

A korábban metiláció-pozitívként azonosított mind az 5 minta 100%-os egyezést mutatott a referenciassay-vel, amit 100%-os (40/40) általános egyezést adott.

Közvetlenül a méhnyaki mintán végzett biszulfít-konverzió

















A „Bisulfite-conversion directly on cervical specimen” (Közvetlenül a méhnyaki mintán végzett biszulfít-konverzió) protokollt a referencia protokollal (vagyis biszulfít-konverzió a minta DNS előzetes minőség-ellenőrzése után) összehasonlítva igazolták 119 méhnyaki kaparékmintával, majd a QIASure Methylation Test kittel. A közvetlenül a méhnyaki mintákon végzett, a méhnyaki minta 2,5%-át bemeneti anyagként használó biszulfít-konverzió sikerességi rátája 95,8% (114/119) volt, és 100%-ra emelkedett, amikor az érvénytelen mintákat újratestelték a méhnyaki minta 10%-át használva bemeneti anyagként. A biszulfít-konverziós protokollok QIASure Methylation Test eredményei közötti egyezés 90,8% (108/119; kappa érték: 0,75) volt.

Irodalomjegyzék

1. Costello, J.F., and Plass, C. (2001) Methylation matters. *J. Med. Genet.* 38, 285–303.
2. Wiltong, 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. Steenberg, 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.

Szimbólumok

A csomagoláson és a címkéken a következő szimbólumok szerepelhetnek:

Szimbólum	Szimbólum meghatározása
	Lejáráti dátum
	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	CE-IVD jelölés szimbólum
	<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz
	Katalógusszám
	Tételszám
	Anyagszám
	Összetevők
	Tartalom
	Szám
Rn	Az R a Használati útmutató (Kézikönyv) módosítását, az n pedig a módosítás számát jelöli
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám
	Hőmérsékleti korlátozás
	Gyártó
	Fénytől védve tárolandó
	Olvassa el a használati utasítást
	Figyelem!

Kapcsolatfelvételi adatok

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért tekintse meg műszaki támogatásunk weblapját a www.qiagen.com/Support címen, hívja a 00800-22-44-6000 telefonszámot, vagy forduljon a QIAGEN valamelyik műszaki szervizosztályához vagy a területileg illetékes forgalmazóhoz (lásd a hátsó borítón vagy a **www.qiagen.com** webhelyen).

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
QIASure Methylation Test Kit	72 reakcióhoz: 2 mesterkeverék, 2 kalibrátor.	616014
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR berendezés és nagy felbontású olvadásigörbe-analizáló (High Resolution Melt, HRM) 5 csatornával (zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin) és HRM csatornával, laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát, üzembe helyezést és oktatást is tartalmaz	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR berendezés és nagy felbontású olvadásigörbe-analizáló (High Resolution Melt, HRM) 5 csatornával (zöld, sárga, narancs, piros, karmazsin), HRM csatorna, laptop, szoftver, tartozékok: az alkatrészekre és a kivitelezésre 1 éves garanciát tartalmaz; üzembe helyezést és oktatást nem tartalmaz	9002032
Rotor-Gene Q MDx tartozékok		
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Alumíniumblokk a reakciók manuális összeállítására egycsatornás pipettával 72 x 0,1 ml-es csövekben	9018901

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250, egyenként 4, kupakkal ellátott csövet tartalmazó strip 1000 reakcióhoz	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 strip 4 csővel és kupakkal 10 000 reakcióhoz	981106
Rotor-Gene AssayManager – a Rotor-Gene Q MDx készülékekkel végzett rutin teszteléshez		
Rotor-Gene AssayManager	Szoftver a Rotor-Gene Q és QIASymphony RGQ készülékekkel végzett rutin teszteléshez; egylicencces szoftver, egyetlen számítógépen telepíthető	9022739

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében, vagy felhasználói kézikönyvében található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói kézikönyvei a www.qiagen.com webhelyen érhetők el, illetve a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

Ezt az oldalt szándékosan hagytuk üresen.

A dokumentum átdolgozási előzményei

Dátum	Módosítások
R4, 2019. június	Munkafolyamat eljárás folyamatábrájának átdolgozása az Alapelvek és eljárás részben; EpiTect Fast 96 Bisulfite Kit hozzáadva a Szükséges, de nem biztosított anyagok részhez; Biztonsági információk szövegdoboz tartalmának átdolgozása; Hozzáadott információ az RGQ MDx 5-plex HRM bemelegítő futtatásáról; Átdolgozott Minta-előkészítés fejezet; További hibaelhárítási tétel hozzáadva; A Közvetlenül a méhnyaki mintán végzett biszulfit-konverzió témakör hozzáadva a Teljesítményjellemzők részhez; Frissített Irodalomjegyzék fejezet; Frissített elrendezés

QIASure Methylation Test korlátozott licenz megállapodás

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a kíthez tartozó komponensekkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a kíthez tartozó komponenseket a termékhez mellékelt protokollokban, a jelen kézikönyvben és a www.qiagen.com webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a kíthez tartozó komponensekbe beépítsék vagy azokkal együtt használják. A további protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsátják más QIAGEN felhasználók rendelkezésére. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sérült harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licenccen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a kít és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A kít és összetevőinek licenccel csak egyszeri használatra érvényes, nem szabad azt újra használni, felújítani vagy újra értékesíteni.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A kít vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztül történő érvényesítésére, valamint a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a kittel és/vagy annak bármely összetevőjével kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárással kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve az ügyvédi költségeket is.

A legújabb licencc feltételekről a www.qiagen.com oldalon tájékozódhat.

A Self-screen B.V. a QIASure Methylation Test hivatalos gyártója.

A QIASure Methylation Test gyártója a Self-screen B.V., európai forgalmazója a QIAGEN.

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony®, *digene*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); BD®, SurePath® (Becton Dickinson); EZ DNA Methylation™ (Zymo Research Corp.); NanoDrop® (NanoDrop Technologies LLC); PreservCyte® (Hologic, Inc.); Qubit® (Molecular Probes, Inc.). A dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. akkor sem tekinthetők a törvény védelmén kívül esőnek, ha nincsenek külön jelöléssel ellátva.

06-2019 HB-2304-004 1117742HU © 2019 QIAGEN, minden jog fenntartva.

Rendelés: www.qiagen.com/shop | Műszaki támogatás: support.qiagen.com | Webhely: www.qiagen.com