



ScreenYu Gyn®

UDI-DI básico: 426076785SCREENYUGYNP6

Instrucciones de uso

REF

SG001-46



Hasta 46 muestras

UDI-DI

4260767852212

Lea atentamente estas instrucciones de uso antes de utilizar la prueba y sígala al pie de la letra para garantizar la fiabilidad de los resultados.




ScreenYu Gyn® es un kit molecular de diagnóstico In-Vitro (IVD), que analiza la presencia de un marcador epigenético mediante la conversión de bisulfito del ADN extraído a partir de las muestras cervicales de pacientes con un resultado VPH+ (para el virus del papilomavirus humano) o con un test de Papanicolaú incierto, que aún debe ser aclarado. Un resultado positivo de ScreenYu Gyn® sugiere la presencia de una neoplasia intraepitelial en el cérvix uterino o de un carcinoma cervical.

Para usar en diagnósticos *in vitro* (DIV) solo por parte de personal cualificado.

Revisión 8 (2025-09)

Traducción publicada 2025-11



Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67 • 01109 Dresden • Alemania

Teléfono: +49 (0) 3641 5548500

contact@epitype.de • www.epitype.de

 **epitype**

ALMACENAR INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA ENTREGA

El ScreenYu Gyn® Kit se envía a temperatura ambiente y la marca de medición de la temperatura se utiliza para controlar si se supera el intervalo de temperatura validado. Inmediatamente después de la recepción, compruebe la marca de medición de temperatura que lleva el kit y confirme si ha cambiado de color. Compruebe también el embalaje exterior, el precinto y el envase primario y cerciórese de que no están dañados. El kit se debe refrigerar inmediatamente después de su recepción a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y protegerse de la luz. Si se transporta y almacena correctamente, el ScreenYu Gyn® Kit y sus componentes se pueden utilizar hasta la fecha indicada.



Control de la temperatura de transporte

La marca de medición de la temperatura que lleva el ScreenYu Gyn® Kit controla la temperatura durante el transporte. Una marca plateada clara indica que el kit se ha entregado cumpliendo la temperatura de transporte. Una marca negra demuestra que no se ha cumplido la temperatura de transporte especificada, lo que significa que ya no se pueden garantizar los parámetros de rendimiento del ScreenYu Gyn® Kit. En ese caso, póngase en contacto con Epitype GmbH.

ÍNDICE

1	Finalidad	4
2	Importancia clínica	4
3	Principio de la prueba	4
4	Diseño del ensayo ScreenYu Gyn®	5
4.1	ScreenYu Gyn® Strips	5
4.2	Controles	5
4.2.1	Control de calidad del tratamiento con bisulfito (marcador de control ACTB)	5
4.2.2	Control positivo	6
4.2.3	Control negativo	6
5	Material de referencia	6
6	Contenido del kit	6
7	Material fungible y equipamiento (no incluidos en el kit)	7
8	Almacenamiento y vida útil	8
9	Instrucciones de seguridad	8
9.1	Información general	8
9.2	Disposición de la sala	9
9.3	Cómo evitar la contaminación	9
9.4	Instrucciones de manipulación	10
10	Eliminación	10
11	Procedimiento de ScreenYu Gyn®	11

11.1	Flujo de trabajo	11
11.2	Muestreo.....	11
11.3	Preparación de la muestra.....	12
11.4	Tratamiento de las muestras con bisulfito.....	12
11.5	PCR	13
11.5.1	Preparación y pipeteo de la PCR	13
11.5.2	Realización de la PCR en el cobas z 480 Analyzer	14
11.5.3	Realización de la PCR en el CFX96 Real-Time PCR Detection System	19
12	Rendimiento de ScreenYu Gyn®	23
12.1	Funcionamiento analítico.....	23
12.1.1	Sensibilidad analítica	23
12.1.2	Especificidad analítica: detección de ADN no metilado.....	24
12.2	Precisión	25
12.2.1	Repetibilidad.....	25
12.2.2	Reproducibilidad.....	25
12.3	Precisión	25
12.4	Precisión	25
12.5	Robustez.....	25
12.6	Punto de corte	25
12.7	Evaluación del funcionamiento clínico	26
13	Límites del procedimiento	27
14	Referencias	27
15	Responsabilidad.....	27
16	Preguntas y problemas	28
17	Notas adicionales.....	28
18	Significado de los símbolos	28
19	Lista de cambios	29
20	Protocolo breve	29

1 FINALIDAD

ScreenYu Gyn® es un kit molecular de diagnóstico In-Vitro (IVD), que analiza la presencia de un marcador epigenético mediante la conversión de bisulfito del ADN extraído a partir de las muestras cervicales de pacientes con un resultado VPH+ (para el virus del papilomavirus humano) o con un test de Papanicolaou incierto, que aún debe ser aclarado. Un resultado positivo de ScreenYu Gyn® sugiere la presencia de una neoplasia intraepitelial en el cérvix uterino o de un carcinoma cervical.

ScreenYu Gyn® está destinado a su uso por parte de personal de laboratorio cualificado y familiarizado con las técnicas de biología molecular. La interpretación de los resultados se debe realizar siempre en conjunción con los resultados de otros procedimientos diagnósticos de laboratorio y teniendo en cuenta también el cuadro clínico.

2 IMPORTANCIA CLÍNICA

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más frecuente en las mujeres de todo el mundo, con más de 600 000 casos nuevos al año [1]. En prácticamente todos los casos, la infección persistente por un virus del papiloma humano (VPH) cancerígeno es la causa subyacente [2] y un requisito previo para el desarrollo del cáncer de cuello uterino. Las mujeres negativas al VPH tienen un riesgo extremadamente bajo de desarrollar cáncer de cuello uterino, pero incluso la mayoría de las mujeres con una infección por VPH no desarrollan un estadio precanceroso. Solo alrededor del 15 % de las mujeres infectadas por el VPH desarrollan realmente un estadio precanceroso o un carcinoma que requiera tratamiento [3].

Por lo tanto, se recomienda a las pacientes con un resultado positivo en la prueba del VPH o con resultados de Papanicolaou pendientes de aclaración (Pap II, Pap III y Pap IIID1 y D2) que utilicen una prueba de triaje como ScreenYu Gyn® para determinar con gran precisión la probabilidad de la presencia de un cáncer o su precursor.

ScreenYu Gyn® no se debe considerar como la decisión terapéutica definitiva, sino que se debe analizar junto con otros hallazgos médicos.

3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

ScreenYu Gyn® se basa en la detección de un biomarcador epigenético, más concretamente la metilación de una sección específica del ADN, cuya presencia se corresponde con la aparición de lesiones precancerosas o cáncer de cuello uterino [4, 5, 6]. Además, se analiza un marcador de referencia específico de bisulfito. Las regiones marcadoras utilizadas se muestran en la tabla siguiente.

Sinopsis de las regiones marcadoras

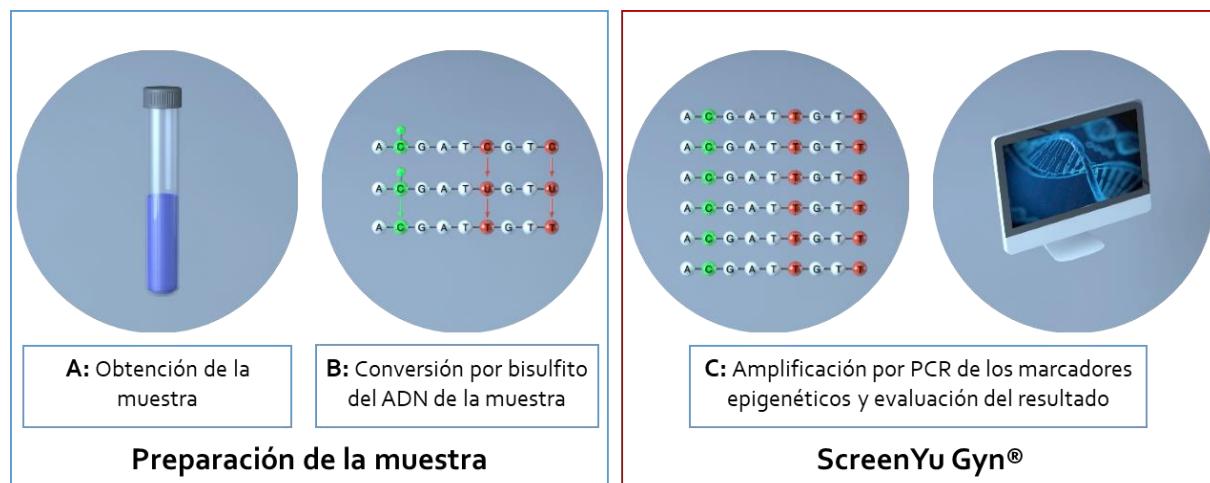
Denominación en el protocolo	Región marcadora (designación del gen)	Colorante fluorescente
Marcador de metilación	ZNF671	ROX
Marcador de control	ACTB	FAM

La detección se realiza mediante el método PCR en tiempo real basado en sondas de alta sensibilidad. Los instrumentos de tiempo real ofrecen el valor Cp (punto de cruce, cobas z 480 Analyzer) o el valor Cq (cuantificación del ciclo, CFX96 Real-Time PCR Detection System), que se corresponden ambos con el valor Ct del umbral del ciclo y así se denominan también en lo sucesivo. Este valor se corresponde con el ciclo en una PCR en tiempo real en el que la fluorescencia se eleva por encima de un valor umbral definido por primera vez.

El análisis de la muestra de una paciente con ScreenYu Gyn® consta de dos pasos.

En primer lugar, el ADN del frotis cervical se convierte mediante bisulfito y se fija la metilación. En el segundo paso, el ADN eluido y tratado con bisulfito se analiza en una PCR en tiempo real basada en sondas y específica de metilación. La sección de ADN originalmente metilada se amplifica selectivamente utilizando los cebadores de las tiras ScreenYu Gyn®. La detección del marcador de metilación y de control se realiza utilizando sondas marcadas con colorantes fluorescentes. Además, se incluye un control positivo y otro negativo para confirmar la PCR. Posteriormente se realiza el análisis específico del ensayo.

El kit de muestreo y el kit de bisulfito no forman parte del kit ScreenYu Gyn® Kit. Los productos diseñados específicamente para el muestreo y el tratamiento con bisulfito están disponibles por separado.



Principio de la prueba

A: el ginecólogo toma un frotis del cuello uterino de la paciente utilizando un kit de muestreo adecuado.

B: el laboratorio de diagnóstico realiza el tratamiento con bisulfito en la muestra de la paciente.

C: se realiza una reacción de PCR dúplex por cada muestra. El análisis se realiza mediante la detección de las sondas marcadas con colorante contenidas en la ScreenYu Gyn® Strip.

4 DISEÑO DEL ENSAYO SCREENYU GYN®

4.1 ScreenYu Gyn® Strips

ScreenYu Gyn® es un ensayo basado en sondas TaqMan. Una tira ScreenYu Gyn® es una tira de PCR de ocho pocillos que contiene dos pares de cebadores en cada pocillo, así como una sonda asociada para la amplificación del marcador específico de metilación ZNF671 y el marcador de control ACTB. Se requiere un pocillo de una ScreenYu Gyn® Strip para el análisis de la muestra de una sola paciente.

4.2 Controles

El diseño del ScreenYu Gyn® Kit incluye tres controles para monitorizar la calidad de la muestra y el tratamiento con bisulfito (marcador ACTB), así como la calidad de la reacción de PCR (control positivo y control negativo).

4.2.1 Control de calidad del tratamiento con bisulfito (marcador de control ACTB)

Este marcador de control verifica la conversión satisfactoria de todas las citosinas no metiladas en uracilo y, por tanto, la calidad del tratamiento con bisulfito realizado. La detección se realiza mediante la amplificación de un fragmento de ADN próximo al gen humano beta-actina (ACTB). Si no hay amplificación de ACTB con un valor Ct inferior a 32, el ensayo de la muestra se considera inválido y debe repetirse.

4.2.2 Control positivo

El control positivo monitoriza la calidad de la PCR. La amplificación del ScreenYu Gyn® Positive Control (PC) debe proporcionar un valor Ct inferior a 38 tanto para el marcador de metilación como para el marcador de control. De lo contrario, la PCR no es válida y se debe repetir.

4.2.3 Control negativo

El control negativo es una reacción de control con ScreenYu Gyn® Water (sin control de plantilla o NTC, por sus siglas en inglés) como plantilla, que debe ser negativa en ambos marcadores. Si se producen valores Ct en el control negativo, es muy probable que haya contaminación y se debe repetir el ensayo ScreenYu Gyn®.

5 MATERIAL DE REFERENCIA

No se dispone de material de referencia internacional.

6 CONTENIDO DEL KIT

Contenido del ScreenYu Gyn® Kit

Designación de los componentes	Símbolo	Contenido	Volumen/cantidad SG001-46
ScreenYu Gyn® Mastermix	PCR-MM	PCR Mastermix ¹ (2)	1 x 0,55 ml
ScreenYu Gyn® Strips	STRIPS	Tira de PCR ²	6 tiras
ScreenYu Gyn® Caps	CAPS	Tapón para tira	6 tapones
ScreenYu Gyn® Positive Control	CONTROL+	Control positivo	1 x 90 µl
ScreenYu Gyn® Water	H₂O	Agua	1 x 2 ml
Instrucciones de uso	-	Instrucciones de uso	1

¹ Contiene todos los componentes necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), excepto los cebadores, las sondas y la plantilla.

² Contiene los cebadores y las sondas necesarios para la PCR.

7

MATERIAL FUNGIBLE Y EQUIPAMIENTO (NO INCLUIDOS EN EL KIT)

ScreenYu Gyn® solo se puede utilizar junto con el material fungible y los equipos indicados y su uso solo se debe confiar a personal cualificado. Todo el equipo de laboratorio necesario debe instalarse, calibrarse, manipularse y someterse a mantenimiento según las instrucciones del fabricante.

La temperatura ambiente se define como entre 15 °C y 30 °C.

Equipos necesarios

Equipamiento	N.º de catálogo	Empresa
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE IVD)	D5030-E, D5031-E	Zymo Research Europe GmbH
PCR microcentrifuge tube PP, 0,1 ml, without cap, low profile, 8-well strip, white, np pcr ready *	04-032-0556	Nerbe plus GmbH & Co. KG
Cap for PCR microcentrifuge tubes PP, 0,1 ml & 0,2 ml, flat, 8-cap strip, highly transparent, np pcr ready *	04-043-0500	Nerbe plus GmbH & Co. KG
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	-	Hologic, Inc.
Cervex-Brush® o Cervex-Brush® Combi	-	Rovers Medical Devices

* Para utilizar como tiras de equilibrio en PCR, véase la disposición de las placas en la página 15 en la página 19.

Para realizar el ensayo ScreenYu Gyn® se necesita el siguiente equipo de laboratorio y material fungible.

- Centrifugadora para tubos de reacción de 0,5 ml / 1,5 ml, $\geq 10\,000$ xg
- Centrifugadora para tiras de PCR
- Termociclador para tubos de reacción de 0,5 ml
- Mezclador vórtex / agitador
- Pipetas con diferentes rangos de volumen y puntas con filtro asociadas (estériles, sin DNasa)
- Soporte para tubos de reacción de 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml
- Gradilla de 96 pocillos para tiras de PCR
- Tubos de reacción para 0,5 ml / 1,5 ml (sin DNasa)
- Etanol 96-100 %, sin desnaturizar
- Dispositivo de PCR en tiempo real, canales de detección para colorantes de sonda FAM y ROX
- ScreenYu Gyn® se ha validado en los siguientes dispositivos de PCR en tiempo real:
 - cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) con bloque de 96 pocillos, adaptador para tiras de PCR y LightCycler® 480 Software UDF 2.0.0 (Service Pack 3), evaluación con la versión 1.5.1.62
 - CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con CFX Maestro Software versión 2.3

8 ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Si se transporta y almacena correctamente, el ScreenYu Gyn® Kit y sus componentes se pueden utilizar hasta la fecha indicada. Todos los reactivos contenidos en el kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada tras su apertura, siempre que se almacenen en las condiciones indicadas y se protejan contra la contaminación.

Temperatura de almacenamiento del ScreenYu Gyn® Kit y del equipo no incluido en el kit

Equipamiento	Temperatura de almacenamiento
ScreenYu Gyn® Kit	Entre 2 °C y 8 °C
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE IVD)	Entre 15 °C y 30 °C
Solución ThinPrep® PreservCyt® (20 ml)	Entre 15 °C y 30 °C
Cervex-Brush® o Cervex-Brush® Combi	Entre 15 °C y 30 °C

9 INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

9.1 Información general

A la hora de establecer métodos de biología molecular de última generación se deben seguir al pie de la letra las instrucciones que se indican a continuación para garantizar la máxima seguridad del personal de laboratorio y obtener resultados de alta calidad:

- Dado que implica procesos de biología molecular como el tratamiento con bisulfito y la amplificación y la detección de ADN, este kit está destinado exclusivamente al diagnóstico *in vitro* y debe ser utilizado solo por personal con formación en prácticas de laboratorio para el diagnóstico *in vitro*.
- Antes de utilizar el producto, lea detenidamente las instrucciones de uso. Solo se debe tener en cuenta la versión actual.
- Lleve puesta una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y, si es necesario, gafas de seguridad para cada paso.
- Evite el contacto directo con las muestras biológicas, así como salpicaduras o pulverizaciones de las mismas.
- La tapa calentada y el bloque de incubación del termociclador pueden alcanzar temperaturas de hasta 110 °C. Existe riesgo de quemaduras en la piel. Tenga en cuenta las instrucciones de uso del dispositivo.
- Lávese bien las manos después de manipular muestras y reactivos.
- No utilice ScreenYu Gyn® si el envase del reactivo está dañado. Póngase en contacto con su distribuidor.
- No utilice el ScreenYu Gyn® Kit después de la fecha de caducidad y no utilice reactivos caducados.
- No mezcle reactivos de lotes diferentes ni mezcle reactivos del kit con reactivos de otros fabricantes.
- Utilice solo los materiales suministrados con el kit o los recomendados por el fabricante.
- Todo el equipo de laboratorio necesario debe instalarse, calibrarse, manipularse y someterse a mantenimiento según las instrucciones del fabricante.

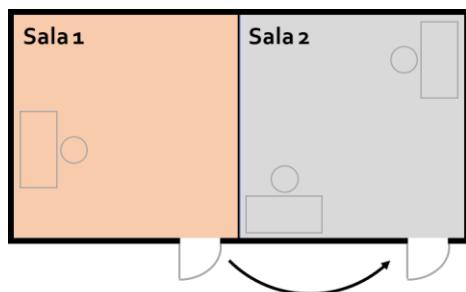
- El pipeteo de pequeños volúmenes de líquido dentro del rango de los microlitros requiere una cierta práctica. Asegúrese de pipetear los volúmenes necesarios con las micropipetas con la mayor precisión posible.
- Se deben cumplir los requisitos normativos aplicables al operador.
- Se presupone el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) tal y como las definen por ejemplo la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) o la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). En concreto, se deben tener en cuenta las recomendaciones para la realización de pruebas de amplificación molecular.
- El buen funcionamiento de los dispositivos de PCR solo está garantizado a temperatura ambiente.

9.2 Disposición de la sala

Debido a la alta sensibilidad analítica de la PCR, se debe prestar la máxima atención a preservar la pureza de los componentes del kit y de las muestras.

La PCR multiplica secciones del ADN de la muestra en un rango entre millones y miles de millones de veces. Incluso las cantidades más pequeñas de estos productos de la PCR (por ejemplo, también diseminados en forma de aerosol) pueden dar lugar a un resultado falso si se arrastran al material de la muestra, a los reactivos para el tratamiento con bisulfito o a los reactivos de la PCR que contiene este kit.

Por lo tanto, un flujo de trabajo limpio y bien estructurado es crucial para evitar resultados incorrectos. Para ello es necesario separar entre sí las áreas de laboratorio para la fase previa a la PCR y la fase posterior a la PCR. Debe haber equipos, material fungible, batas de laboratorio y guantes por separado en cada área. No transfiera nunca de una zona a otra batas de laboratorio, guantes o equipos. La figura siguiente muestra un ejemplo de un laboratorio dividido en dos salas separadas. Una zona está destinada solo al tratamiento con bisulfito y a la preparación de la PCR, mientras que en la otra se lleva a cabo la propia PCR.



División espacial

El tratamiento con bisulfito de las muestras y toda la preparación de la PCR se realizan en la sala 1 (es ideal usar una campana de PCR). En la sala 2 se lleva a cabo, se detecta y se analiza la PCR.

9.3 Cómo evitar la contaminación

- Se debe llevar puesta una bata de laboratorio y guantes desechables durante todos los pasos.
- Los guantes desechables se deben sustituir con frecuencia y siempre después de una (presunta) contaminación con reactivos o material de muestra.
- Todas las superficies, equipos y suministros se deben descontaminar con una solución de limpieza adecuada (agentes destructores del ADN).
- No toque el interior de los tubos de reacción ni sus tapones.
- Al pipeteo hay que utilizar siempre puntas con filtro (carentes de DNasa, RNasa y ADN humano) para descartar una posible contaminación cruzada a través de los aerosoles generados durante el pipeteo. Las puntas se deben cambiar siempre entre los distintos pasos del pipeteo.

- Es importante realizar controles negativos para detectar posibles contaminaciones.

9.4 Instrucciones de manipulación

- Guarde los componentes no utilizados en el envase original hasta su uso.
- Todos los pasos de centrifugación se deben realizar a temperatura ambiente.
- El flujo de trabajo se puede interrumpir después del tratamiento con bisulfito. En este punto, las muestras se pueden almacenar durante una semana a entre 2 °C y 8 °C o hasta dos meses a entre -15 °C y -30 °C.
- Las tiras ScreenYu Gyn® Strips y los tapones ScreenYu Gyn® Caps no se deben tocar sin guantes desechables en ningún momento del procedimiento, ya que de lo contrario se podrían producir señales de fluorescencia inespecíficas.
- Las ScreenYu Gyn® Strips y los ScreenYu Gyn® Caps están destinados a un solo uso y no se pueden reutilizar.
- Conserve en su envase original las ScreenYu Gyn® Strips y los ScreenYu Gyn® Caps no utilizados. Es imprescindible que mantenga las tiras ScreenYu Gyn® Strips protegidas de la luz.

10 ELIMINACIÓN

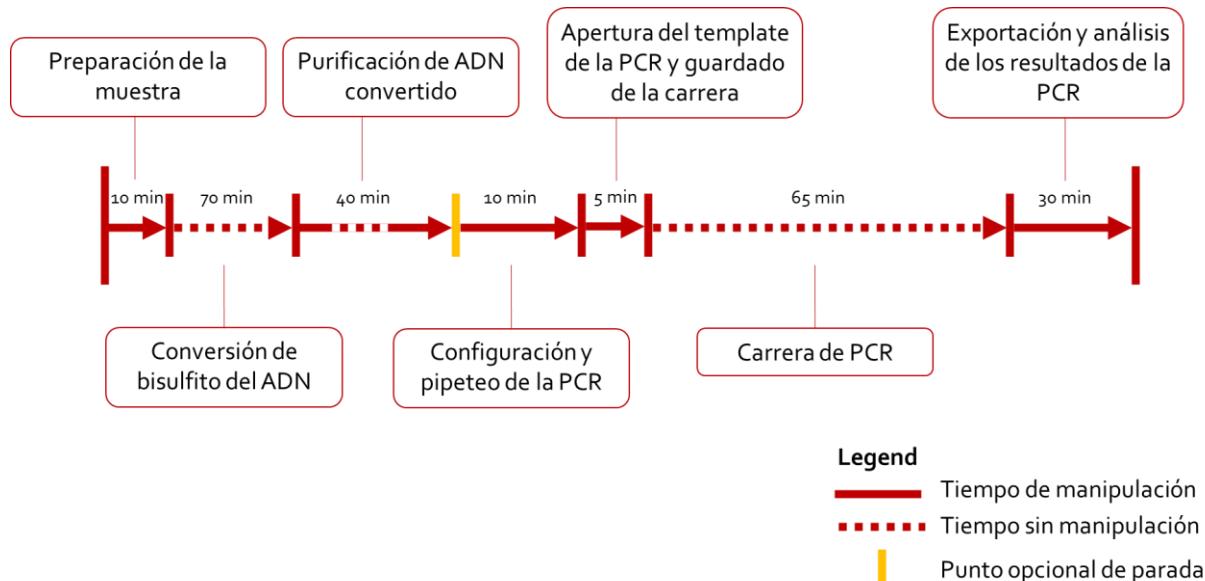
El ScreenYu Gyn® Kit no utilizado y sus componentes se pueden desechar sin precauciones especiales. Las muestras de pacientes y los tubos de reacción usados se deben tratar como residuos infecciosos. Todos los reactivos se deben desechar cumpliendo la normativa legal.

11 PROCEDIMIENTO DE SCREENYU GYN®

El siguiente capítulo contiene una descripción detallada de los diferentes pasos, desde el muestreo hasta el análisis de los datos.

11.1 Flujo de trabajo

En total, ScreenYu Gyn® se puede realizar en menos de cuatro horas. El tiempo de trabajo activo es de aproximadamente dos horas. Durante el procedimiento inicial de ScreenYu Gyn®, se deben prever 15 minutos para la creación de la plantilla de PCR.



Cronograma del flujo de trabajo de ScreenYu Gyn®

11.2 Muestreo

El kit de muestreo no está incluido en el ScreenYu Gyn® Kit. Los viales ThinPrep® PreservCyt® (Hologic, Inc.) y los dispositivos de muestreo Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) están disponibles a través de los respectivos fabricantes. La recogida de una muestra cervical por parte del médico se debe realizar según las instrucciones del fabricante y garantizando el cumplimiento de las directrices generalmente aceptadas para la recogida de una muestra de frotis cervical [7].

Importante: el cabezal del cepillo del dispositivo de recogida de muestras no debe permanecer en el recipiente de muestras después de la recogida, ya que de lo contrario se perjudicará el rendimiento de ScreenYu Gyn®.

Se debe utilizar como medio de frotis ThinPrep® PreservCyt® Solution. El uso de otros medios de muestra no forma parte de la validación del ensayo ScreenYu Gyn®.

Garantizar la buena calidad de la muestra de ADN empleada es un requisito previo importante para la validez del ensayo. Si no se realiza adecuadamente la toma de muestras, el tratamiento con bisulfito y el almacenamiento del ADN, se pueden obtener resultados inválidos o incluso falsos negativos.

Las muestras cervicales se pueden transportar al laboratorio sin refrigeración para su análisis. Las muestras se pueden almacenar hasta 1,5 años a una temperatura de entre 2 °C y 30 °C.

11.3 Preparación de la muestra

Los siguientes pasos se deben llevar a cabo en la zona de preparación de muestras (sala 1).

Importante: si el cabezal del cepillo de recogida de torundas se encuentra dentro del vial de muestras, primero debe extraerse y desecharse.

- Agite en vórtex todas las muestras de pacientes durante 5 segundos a velocidad máxima y transfiera inmediatamente 1 ml del medio a un tubo de reacción de 1,5 ml.

Precaución: las células se depositan en el fondo del tubo muy rápido. ¡No deben transcurrir más de 10 segundos entre la mezcla de la muestra del paciente y la toma de la muestra de 1 ml!

- Centrifugue la muestra durante **5 minutos a 10 000 xg**.
- Retire con cuidado 900 µl de sobrenadante por encima del precipitado sin destruirlo.

Precaución: dependiendo de la naturaleza de la muestra, el precipitado es más o menos sólido.

- Resuspenda el precipitado agitándolo en vórtex durante 3 segundos. Añada 20 µl de la muestra resuspendida al tratamiento con bisulfito. Deseche los 80 µl restantes.

11.4 Tratamiento de las muestras con bisulfito

El kit de bisulfito no está incluido en el ScreenYu Gyn® Kit. ScreenYu Gyn® se validó con el EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH).

- **Punto de partida:** Añada **20 µl de la muestra resuspendida + 130 µl de Lightning Conversion Reagent** a un tubo de reacción de 0,5 ml.
- Realice el tratamiento con bisulfito siguiendo las instrucciones del fabricante del EZ DNA Methylation-Lightning Kit, salvo las siguientes modificaciones:
 - Deseche el flujo después del último paso de lavado.
 - Centrifugue la columna en el Collection Tube vacío durante **1 minuto a máxima velocidad** para secarla completamente.

Atención: No omita este paso, ya que el Etanol residual puede perjudicar el rendimiento del ensayo ScreenYu Gyn®.

- **Eluir en 15 µl de M-Elution Buffer** durante **30 segundos a 8000 xg**.

11.5 PCR

Antes de iniciar la PCR, asegúrese de que el protocolo de temperatura de la PCR está programado en el dispositivo de PCR en tiempo real adecuado a fin de minimizar el tiempo entre la preparación y el inicio de la PCR. Para establecer el programa de PCR en el cobas z 480 Analyzer, proceda como se describe en la página 14. La explicación para la PCR en el CFX96 Real-Time PCR Detection System figura a partir de la página 19.

11.5.1 Preparación y pipeteo de la PCR

Importante: la preparación y el pipeteo de la PCR no deben durar más de 60 minutos. Este paso se realiza en la sala 1 (área de la fase previa a la PCR).

Tenga en cuenta la disposición de placa descrita en la página 15 o 19 respectivamente. El control positivo (PC) se debe pipetear en el pocillo A1 y el control negativo (NTC) en el pocillo B1.

- Extraiga el **ScreenYu Gyn® Mastermix** y el número necesario de **tiras ScreenYu Gyn® Strips** y colóquelas en una gradilla de 96 pocillos.

Precaución: una tira **ScreenYu Gyn® Strip** es suficiente para ocho ensayos de PCR. Tenga en cuenta que se debe realizar un control positivo y un control negativo (agua, NTC) para cada ejecución de PCR.

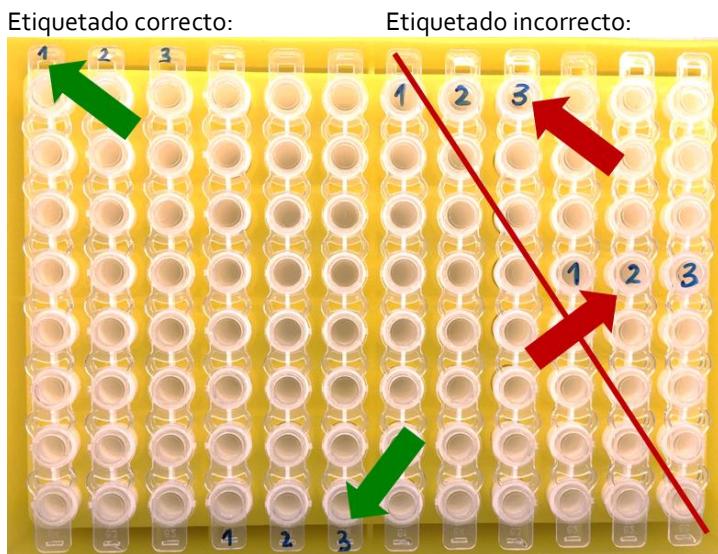
- Agite en vórtex el **ScreenYu Gyn® Mastermix** durante 3 segundos a velocidad máxima y centrifúguelo.
- Retire los **tapones de PCR** de las ScreenYu Gyn® Strips y **deséchelos**.
- Añada **10 µl** de **ScreenYu Gyn® Mastermix** a cada pocillo de la **ScreenYu Gyn® Strip**.
- Agite el eluido de la muestra en vórtex durante 3 segundos a velocidad máxima y centrifugue brevemente.
- Añada **10 µl de la muestra** al pocillo lleno de **ScreenYu Gyn® Mastermix**.

Importante: cambie la punta de la pipeta en cada paso de pipeteo.

Nota: Conserve el resto de los eluidos de la muestra para repetir la PCR ScreenYu Gyn® si fuera necesario.

- Agite en vórtex el **ScreenYu Gyn® Positive Control** durante 3 segundos a velocidad máxima y centrifúguelo.
- Añada **10 µl de ScreenYu Gyn® Positive Control** al pocillo A1 y **10 µl de ScreenYu Gyn® Water** al pocillo B1 como control negativo.
- Cierre cada **ScreenYu Gyn® Strip** con una **ScreenYu Gyn® Cap** sin usar (bolsa transparente).

Precaución: no toque el interior de las **ScreenYu Gyn® Strips** ni de los **ScreenYu Gyn® Caps**. Asegúrese de que el **ScreenYu Gyn® Cap** esté bien asentado en la **ScreenYu Gyn® Strip** después de cerrarlo. La mejor forma de verificarlo es mediante una inspección visual desde el lateral.

**Precaución:**

no etiquete la parte de los tapones que está directamente encima de los pocillos, ya que la señal de PCR se lee desde arriba a través de los tapones y esto daría lugar a señales de fluorescencia incorrectas.

Se puede utilizar para el etiquetado el cierre grande de la parte superior e inferior del tapón.

- Agite en vórtex todas las **ScreenYu Gyn® Strips** cerradas durante 3 segundos a velocidad máxima y centrifúguelas.

11.5.2 Realización de la PCR en el cobas z 480 Analyzer

En la siguiente sección se describe cómo realizar ScreenYu Gyn® en los sistemas de PCR en tiempo real cobas z 480 Analyzer (marcado en azul) y CFX96 Real-Time PCR Detection System (marcado en verde). No obstante, siga siempre las instrucciones del fabricante acerca del funcionamiento de los dispositivos de PCR.

La PCR se debe realizar en la sala 2.

11.5.2.1 Creación de una plantilla de PCR

Si ha creado y guardado la plantilla de PCR anteriormente, puede continuar con [11.5.2.2 Inicio de la ejecución de la PCR](#).

- Encienda el cobas z 480 Analyzer y su ordenador. En un plazo de 15 segundos, seleccione «User defined Workflow» en la pantalla del ordenador en la BIOS para cambiar a un modo de dispositivo de libre programación.
- Abra el software e inicie sesión.
- Seleccione «Tools»  en la barra de acciones de la derecha y cree un nuevo *Detection Format*. Póngale como nombre «ScreenYu Gyn». Seleccione la combinación de filtros 465-510 y 540-610 (excitación-emisión). Cierre la ventana pulsando el botón *Close*.
- Seleccione *New Experiment* para crear una nueva plantilla. En la pestaña *Run Protocol*, establezca el *Detection Format* como *ScreenYu Gyn* y fije el *Reaction Volume* en 20 µl. Programe el protocolo de temperatura según la tabla siguiente.

Protocolo de temperatura de PCR en el cobas z 480 Analyzer

Programme Name	Number of cycles	Analysis Mode	Target	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)
Initialization	1 x	None	94 °C	None	00:01:00	4.4
Amplification	42 x	Quantification	94 °C	None	00:00:15	4.4
			61 °C	Single	00:00:30	2.2
Cooling	1 x	None	37 °C	None	00:01:00	2.2

- Guarde la plantilla de ejecución con el nombre ScreenYu Gyn seleccionando *Apply Template* → *Save as Template* y almacenando la plantilla en la ubicación deseada.

11.5.2.2 Inicio de la ejecución de la PCR

Si ha guardado la plantilla de PCR anteriormente, ahora puede acceder a ella haciendo clic en *New Experiment from Template* → *ScreenYu Gyn*. Compruebe que está ajustado el protocolo de temperatura correcto.

- Dependiendo de la disposición de placa, seleccione una *Subset Template* en el *Subset Editor*. Para ello, pulse el botón «+», seleccione todos los pocillos ocupados en la disposición y confirme la plantilla con el botón *Apply*. Esta *Subset Template* se puede guardar en la ubicación deseada mediante *Apply Template* → *Save as Template*.
- Seleccione una disposición de placa adecuada:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	NTC											
C	1											
D	2											
E	3											
F	4											
G	5											
H	6											

Ejemplo de disposición de placa para seis muestras de pacientes (1-6)

El análisis de una placa ocupada de forma incompleta se realiza mediante un subconjunto definido en el *Subset Editor*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	7	15	23	31	39						
B	NTC	8	16	24	32	40						
C	1	9	17	25	33	41						
D	2	10	18	26	34	42						
E	3	11	19	27	35	43						
F	4	12	20	28	36	44						
G	5	13	21	29	37	45						
H	6	14	22	30	38	46						

Ejemplo de disposición de placa para 46 muestras de pacientes (1-46)

El análisis de una placa ocupada de forma incompleta se realiza mediante un subconjunto definido en el *Subset Editor*.

Importante: la disposición de placa no es variable. El control positivo (PC) se debe colocar en el pocillo A1 y el control negativo (NTC) en el pocillo B1.

Las posiciones vacías deben rellenarse con tiras vacías (Balance Strips) para el equilibrado, véase el capítulo 7.

- Defina el etiquetado de la muestra en el *Sample Editor* seleccionando una plantilla de subconjunto definida en el *Step 2: Select Samples* → *Subset* e introduciendo el *Sample Name* en el *Step 3: Edit Properties*. Esta plantilla de muestra se puede guardar en la ubicación deseada mediante *Apply Template* → *Save as Template*.
- Coloque las tiras verticalmente en el dispositivo de PCR en el orden definido.

Importante: Utilice el adaptador para tiras de PCR (de Roche Diagnostics GmbH).

- Guarde la ejecución de PCR con un nombre inequívoco en la carpeta deseada pulsando el botón de «disquete» e inicie la ejecución de PCR pulsando el botón *Start Run* en la pestaña *Run Protocol (Experiment Editor)*.

11.5.2.3 Exportación de los datos

Si está analizando la ejecución de PCR directamente en el ordenador del cobas z 480 Analyzer, continúe con 11.5.2.4 Análisis de los datos de la PCR.

- Una vez finalizada la PCR (*Run complete*), exporte la ejecución de PCR mediante  «Export» y guarde el archivo en la ubicación deseada.

11.5.2.4 Análisis de los datos de la PCR

A continuación se describe el análisis de los datos exportados. Estas instrucciones se han creado utilizando el programa de hojas de cálculo Microsoft Excel. También es posible utilizar otros programas adecuados.

- Si ha exportado la ejecución de PCR, inicie el software LightCycler® 480 en otro ordenador y abra/importe la ejecución de PCR. De lo contrario, realice el análisis en el ordenador del cobas z 480 Analyzer
- En *Analysis*, seleccione el algoritmo de análisis *Abs Quant/Fit Points* y el subconjunto especificado, si es necesario.
- En la pestaña *Cycle Range*, establezca los siguientes parámetros: *First Cycle 1*, *Last Cycle 42* y el *Background* de 5 a 20, estableciendo un *Min Offset* de 4 y un *Max Offset* de 19.
- En la pestaña *Noise Band*, compruebe que el *STD Multiplier* está ajustado a 12 y la *Noise Band* se calcula automáticamente.
- Debido a la detección de dos colorantes fluorescentes diferentes, el análisis de los datos de la PCR se realiza por separado para cada marcador. El respectivo canal de detección se selecciona mediante el botón *Filter Comb*:

Combinaciones de filtros y ajustes de umbral en el cobas z 480 Analyzer

Marcador	Canal de detección	Sonda	Umbral
ACTB	465 - 510	FAM	1,2
ZNF671	540 - 610	ROX	0,5

- En la pestaña *Analysis*, compruebe que el número de *Fit Points* está fijado en 2.
- Para **ACTB** seleccione *Filter Comb 465 – 510* y fije *Threshold* en **1,2** y pulse el botón *Calculate* para realizar el análisis. Exporte la tabla de datos como archivo .txt haciendo clic con el botón derecho del ratón en *Export Table* en *Samples* y guárdela en una ubicación adecuada con un nombre inequívoco.
- A continuación, para **ZNF671** seleccione *Filter Comb 540 – 610* y fije el *Threshold* en **0,5** y pulse el botón *Calculate* para realizar el análisis. Exporte la tabla de datos como archivo .txt haciendo

clic con el botón derecho del ratón en *Export Table* en *Samples* y guárdela en una ubicación adecuada con un nombre inequívoco.

Precaución: analice siempre los dos marcadores uno tras otro tal como se ha descrito, ya que el programa aplica siempre a todos los filtros los valores umbral fijados manualmente.

- Abra un programa de hoja de cálculo como Microsoft Excel y copie en él todos los datos de ambos archivos .txt, tanto para el marcador ZNF671 (filtro seleccionado: 540-610) como para el marcador ACTB (filtro seleccionado: 465-510).
- Formatee los datos de modo que los resultados de las distintas muestras se presenten uno debajo del otro y los marcadores ZNF671 y ACTB se presenten uno al lado del otro.

Pos	Name	Cp ZNF671	Cp ACTB	ΔCp ZNF671-ACTB
A1	PC	31,98	32,12	
B1	NTC			
C1	Muestra 1		36,22	
D1	Muestra 2	36,39	30,22	6,17
E1	Muestra 3		31,50	
F1	Muestra 4		31,27	
G1	Muestra 5	31,61	30,32	1,29
H1	Muestra 6		31,21	

Comprobación de la validez de la ejecución de PCR

La ejecución de la PCR es válida si los controles positivo y negativo cumplen los siguientes criterios:

Criterios de validez de los controles ScreenYu Gyn®

Marcador	Valor Cp para el control positivo	Valor Cp para el control negativo
ZNF671	≥ 20; ≤ 38	Sin valor
ACTB	≥ 20; ≤ 38	Sin valor

Comprobación de la validez de las muestras

El resultado para la muestra de la paciente es válido si el marcador de control ACTB cumple el siguiente criterio:

Criterios de validez de la muestra de la paciente

Marcador	Valor Cp para la muestra de la paciente
ACTB	≥ 20; ≤ 32

Análisis del ensayo ScreenYu Gyn®

Si el marcador de metilación ZNF671

- No arroja un valor Cp, el **resultado de ScreenYu Gyn®** para esta muestra se considerará **negativo**.
- Arroja un valor Cp > 0; < 20, el **resultado de ScreenYu Gyn®** para esta muestra se considerará **inválido**.

- Arroja un valor $Cp \geq 20; \leq 42$, el ΔCp se calcula según la siguiente ecuación:

Cálculo de ΔCp

$$\Delta Cp = Cp_{ZNF671} - Cp_{ACTB}$$

Si $\Delta Cp \leq 9,00$, el resultado de ScreenYu Gyn® para esta muestra se considerará **positivo**.

Si $\Delta Cp > 9,00$, el resultado de ScreenYu Gyn® para esta muestra se considerará **negativo**.

Un resultado positivo de la prueba ScreenYu Gyn® se asocia con la presencia de una neoplasia intraepitelial cervical o un cáncer de cuello uterino. ScreenYu Gyn® no se debe considerar como la decisión terapéutica definitiva, sino que se debe analizar junto con otros hallazgos médicos.

11.5.3 Realización de la PCR en el CFX96 Real-Time PCR Detection System

11.5.3.1 Creación de una plantilla de PCR

- Encienda el dispositivo de PCR.
- Programe el protocolo de temperatura de la PCR como se describe en la siguiente tabla seleccionando y editando los pasos de temperatura y los tiempos.

Protocolo de temperatura de la PCR ** en el CFX96 Real-Time PCR Detection System

Programme Name	Step	Number of cycles	Temperature	Time (m:ss)
Initialization	1	1 X	94 °C	1:00
	2		94 °C	0:15
Amplification	3*	42 X	61 °C	0:30
	4		GO TO Step 2	41 X
Cooling	5	1 X	30 °C	1:00

* La señal de fluorescencia se detecta mediante «Plate Read» («Leer la placa») durante el paso 3, lo que se simboliza con el símbolo de la cámara.

** En el CFX96 Real-Time PCR Detection System, la velocidad de rampa por defecto es de 5 °C/seg. Este ajuste se utilizó para validar esta prueba DIV.

- Ajuste el volumen de reacción a 20 µl y la temperatura del calentador de la tapa a 105 °C.
- Guarde la plantilla de PCR con el nombre *ScreenYu Gyn*.

11.5.3.2 Inicio de la ejecución de la PCR

Si ha guardado la plantilla de PCR anteriormente, ahora puede acceder a ella. Compruebe que está ajustado el protocolo de temperatura correcto.

- Coloque las **ScreenYu Gyn® Strips** en el dispositivo de PCR introduciéndolas verticalmente en los pequeños pocillos del bloque calefactor. Seleccione una disposición de placa adecuada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	NTC											
C	1											
D	2											
E	3											
F	4											
G	5											
H	6											

Ejemplo de disposición de placa para seis muestras de pacientes (1-6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	7	15	23	31	39	Balance Strip					
B	NTC	8	16	24	32	40						
C	1	9	17	25	33	41						
D	2	10	18	26	34	42						
E	3	11	19	27	35	43						
F	4	12	20	28	36	44						
G	7	13	21	29	37	45						
H	6	14	22	30	38	46						

Ejemplo de disposición de placa para 46 muestras de pacientes (1-46)

Importante: la disposición de placa **no** es variable. El control positivo (PC) se debe colocar en el pocillo A1 y el control negativo (NTC) en el pocillo B1.

Las posiciones vacías deben rellenarse con tiras vacías (Balance Strips) para el equilibrado, véase el capítulo 7.

- Designe la ejecución utilizando un nombre de archivo adecuado. Compruebe que *All Channels* esté seleccionado antes de iniciar la ejecución.

11.5.3.3 Exportación de los datos

- Tras completar la PCR, exporte la ejecución de PCR (archivo .pcrd).

11.5.3.4 Análisis de los datos de la PCR

A continuación se describe el análisis de los datos exportados.

- En un ordenador, abra el software BioRad CFX y establezca primero *Plate Type: BR White* en *User → User Preferences → Plate* para indicar que se utiliza plástico blanco.
- Importe el archivo .pcrd.
- Defina la disposición de placa en *Plate Setup → View/Edit Plate*. Pulse el botón *Select Fluorophores* para seleccionar los colorantes empleados FAM y ROX. Los marcadores correspondientes ACTB (FAM) y ZNF671 (ROX) se pueden seleccionar en *Target Names*. Introduzca el nombre en *Sample Names*.
- Las posiciones sin ocupar se marcan y se pueden excluir del análisis seleccionando *Exclude Wells in Analysis*.
- Confirme la disposición de la placa en *OK*.
- Establezca los ajustes del análisis en *Settings*. Los parámetros en *Baseline Threshold* se deben definir por separado para cada fluoróforo. Para ello, es necesario anular la selección o seleccionar los marcadores en la pestaña *Quantification*.

Ajustes de análisis en el CFX96 Real-Time PCR Detection System

Parameter	Setting
Cq Determination Mode	Single Threshold
Baseline Setting	Baseline Subtracted Curve Fit
	Apply Fluorescence Drift Correction
Analysis Mode	Target
Cycles to Analyze	1-42
Baseline Threshold	Baseline Cycles → User Defined: Begin: 5; End: 20 Single Threshold → User Defined: 200

- Seleccione todas las muestras y exporte los datos de ambos marcadores al mismo tiempo como archivo .xlsx a una ubicación adecuada con un nombre inequívoco haciendo clic con el botón derecho del ratón en *Export to Excel*.
- Formatee los datos de modo que los resultados de las distintas muestras se presenten uno debajo del otro y los marcadores ZNF671 y ACTB se presenten uno al lado del otro.

Pos	Name	Cq _{ZNF671}	Cq _{ACTB}	ΔCq _{ZNF671-ACTB}
A1	PC	30,32	30,33	
B1	NTC			
C1	Muestra 1		34,16	
D1	Muestra 2	35,74	29,24	6,50
E1	Muestra 3		29,60	
F1	Muestra 4		29,47	
G1	Muestra 5	30,61	28,48	2,13
H1	Muestra 6		28,72	

Comprobación de la validez de la ejecución de PCR

La ejecución de la PCR es válida si los controles positivo y negativo cumplen los siguientes criterios:

Criterios de validez de los controles ScreenYu Gyn®

Marcador	Valor Cq para el control positivo	Valor Cq para el control negativo
ZNF671	≥ 20; ≤ 38	Sin valor
ACTB	≥ 20; ≤ 38	Sin valor

Comprobación de la validez de las muestras

El resultado para la muestra de la paciente es válido si el marcador de control ACTB cumple el siguiente criterio:

Criterios de validez de la muestra de la paciente

Marcador	Valor Cq para la muestra de la paciente
ACTB	≥ 20; ≤ 32

Análisis del ensayo ScreenYu Gyn®

Si el marcador de metilación ZNF671

- No arroja un valor Cq, el **resultado de ScreenYu Gyn®** para esta muestra se considerará **negativo**.
- Arroja un valor $Cq > 0; < 20$, el **resultado de ScreenYu Gyn®** para esta muestra se considerará **inválido**.
- Arroja un valor $Cq \geq 20; \leq 42$, el ΔCq se calcula según la siguiente ecuación:

Cálculo de ΔCq

$$\Delta Cq = Cq_{ZNF671} - Cq_{ACTB}$$

Si $\Delta Cq \leq 10,00$, el **resultado de ScreenYu Gyn®** para esta muestra se considerará **positivo**.

Si $\Delta Cq > 10,00$, el **resultado de ScreenYu Gyn®** para esta muestra se considerará **negativo**.

Un resultado positivo de la prueba ScreenYu Gyn® se asocia con la presencia de una neoplasia intraepitelial cervical o un cáncer de cuello uterino. ScreenYu Gyn® no se debe considerar como la decisión terapéutica definitiva, sino que se debe analizar junto con otros hallazgos médicos.

12 RENDIMIENTO DE SCREENYU GYN®

Se muestran los datos de rendimiento del CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. En caso de desviaciones de los datos del cobas z 480 Analyzer, estos se enumeran por separado. Si los datos del cobas z 480 Analyzer no se muestran explícitamente, se corresponden con los datos mostrados para el CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

12.1 Funcionamiento analítico

12.1.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del ensayo PCR se determinó utilizando ADN genómico humano metilado y convertido por bisulfito. Los respectivos límites de detección figuran en la tabla siguiente. Las series de dilución se probaron en determinación de 9 veces. Por término medio, en el ensayo se utilizan 120-180 ng de ADN para un frotis.

Sensibilidad analítica: parte 1

ADN utilizado	Número aproximado de células en el ensayo*	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
0,2 ng	30 células	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 células	9 / 9	9 / 9
0,05 ng	7,5 células	9 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 células	9 / 9	9 / 9
0,01 ng	1,5 células	9 / 9	7 / 9
0,005 ng	< 1 célula	5 / 9	3 / 9

* Una célula contiene aprox. 6 - 7 pg de ADN genómico

El límite de detección para los dos marcadores en el CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System es de un total de tres células (0,02 ng) en la muestra total.

En el cobas z 480 Analyzer, el límite de detección para los dos marcadores es de un total de 7,5 células (0,05 ng) en la muestra total.

Los límites de cuantificación del ensayo ScreenYu Gyn® se corresponden con los límites de detección, lo que da lugar a una linealidad de $R^2 = 0,99$ para ambos marcadores dentro de los límites de cuantificación.

Además, se ensayó una mezcla de ADN humano genómico metilado convertido por bisulfito y ADN humano genómico no metilado. En cada caso, se utilizaron 20 ng de ADN o 100 ng de ADN por ensayo. Las series de dilución se ensayaron por triplicado o en determinación de 9 veces.

Sensibilidad analítica: parte 2

Proporción de ADN metilado	ADN total	ScreenYu Gyn® positivo
10 %	20 ng	3 / 3
1 %	20 ng	9 / 9
0,1 %	20 ng	9 / 9
0,01 %	20 ng	4 / 9
0 %	20 ng	0 / 9
10 %	100 ng	3 / 3
1 %	100 ng	9 / 9
0,1 %	100 ng	9 / 9
0,01 %	100 ng	1 / 9
0 %	100 ng	0 / 9

El límite de detección para un resultado positivo del marcador ZNF671 es del 0,1 % de ADN metilado para una muestra que contenga un total de 20 ng de ADN o 100 ng de ADN por ensayo.

12.1.2 Especificidad analítica: detección de ADN no metilado

La especificidad analítica del ensayo PCR se determinó utilizando fragmentos de PCR no metilados de 10 - 12 kb representativos del genoma humano. Se realizó una determinación de 5 veces. Los resultados se muestran en la tabla siguiente. Las muestras se clasificaron como válidas mediante el marcador ACTB. Hasta una concentración de 1000 ng de ADN no metilado y convertido por bisulfito (biADN), no se obtuvo ningún resultado de ScreenYu Gyn® falso positivo.

Especificidad analítica del ensayo de PCR

ADN utilizado	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
100 ng de biADN no metilado	0 / 5	5 / 5
250 ng de biADN no metilado	0 / 5	5 / 5
500 ng de biADN no metilado	0 / 5	5 / 5
1.000 ng de biADN no metilado	0 / 5	5 / 5
1000 ng de ADN genómico	0 / 5	0 / 5

12.2 Precisión

12.2.1 Repetibilidad

Se analizaron dos muestras de pacientes convertidas por bisulfito en diez ejecuciones independientes con el ensayo ScreenYu Gyn® (cuatro réplicas cada una). En las 40 determinaciones, la muestra Pap I tuvo un resultado de ScreenYu Gyn® negativo y la CIN3 tuvo un resultado de ScreenYu Gyn® positivo. Así pues, las muestras presentan una repetibilidad del 100 %.

12.2.2 Reproducibilidad

En cinco centros, se analizaron 20 muestras de pacientes con ScreenYu Gyn®. Cada vez, diferentes personas realizaron una nueva preparación de la muestra y el tratamiento con bisulfito utilizando diferentes dispositivos de qPCR (cobas z 480 Analyzer LightCycler® 480 I, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System).

18 de las 20 muestras de pacientes fueron coherentes. Esto arroja una reproducibilidad del 90 %.

12.3 Precisión

La precisión del ensayo ScreenYu Gyn® se verificó mediante secuenciación Sanger utilizando 15 muestras de pacientes. Las muestras de pacientes probadas negativamente no mostraron citosinas metiladas en la respectiva región genómica. Las muestras de pacientes probadas positivamente mostraron la región genómica ZNF671 correcta con un alto grado de metilación dentro de la secuencia.

12.4 Precisión

Se indica la precisión como suma de la precisión y la corrección del ensayo ScreenYu Gyn®.

12.5 Robustez

No se observaron interferencias en las muestras de frotis enriquecidas con células SiHa cuando se añadieron a la muestra concentraciones crecientes de las siguientes sustancias:

- Hasta un 0,5 % de solución de Lugol
- Hasta un 0,5 % de ácido acético

12.6 Punto de corte

El punto de corte óptimo del ensayo se determinó mediante el denominado «índice de Youden». Para que el resultado de ScreenYu Gyn® sea positivo se deben cumplir los siguientes criterios:

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

$\Delta Cq_{ZNF671-ACTB} \leq 10 \rightarrow$ el resultado de ScreenYu Gyn® es positivo

$\Delta Cq_{ZNF671-ACTB} > 10 \rightarrow$ el resultado de ScreenYu Gyn® es negativo

Cobas z 480 Analyzer

$\Delta Cp_{ZNF671-ACTB} \leq 9 \rightarrow$ el resultado de ScreenYu Gyn® es positivo

$\Delta Cp_{ZNF671-ACTB} > 9 \rightarrow$ el resultado de ScreenYu Gyn® es negativo

12.7 Evaluación del funcionamiento clínico

Las muestras de pacientes utilizadas aquí se obtuvieron de clínicas europeas (Alemania, Portugal).

El tratamiento con bisulfito de las muestras de pacientes con el EZ DNA Methylation-Lightning Kit se realizó con una velocidad de centrifugación de 18 000 xg y un tiempo de desulfonación de 20 minutos.

Para la evaluación del funcionamiento clínico de ScreenYu Gyn®, se examinaron 616 muestras de pacientes con la siguiente distribución de prevalencia de hallazgos: Pap I (n = 380; 61,7 %), CIN 1 (n = 47; 7,6 %), CIN 2 (n = 50; 8,1 %), CIN 3 (n = 132; 21,4 %), cáncer de cuello uterino (n = 7; 1,1 %). La tasa de muestras no válidas fue del 1,3 % (n = 8).

A partir del punto de corte establecido se calculó la sensibilidad y la especificidad clínicas.

Evaluación del funcionamiento clínico de ScreenYu Gyn®

Hallazgos según citología/histología	Detección	CI 95 %
Pap I (n = 375)	9,33 %	6,6 % - 12,7 %
CIN 1 (n = 46)	23,91 %	12,6 % - 38,8 %
CIN 2 (n = 48)	35,42 %	22,2 % - 50,5 %
CIN 3 (n = 132)	62,88 %	54,0 % - 71,1 %
CxCa (n = 7)	100,00 %	59,0 % - 100 %

Datos de funcionamiento clínico CIN 3+ / Pap I	Valor	CI 95 %
Sensibilidad	64,75 %	56,2 % - 72,7 %
Especificidad	90,67 %	87,3 % - 93,4 %
Valor predictivo positivo	72,00 %	63,3 % - 79,7 %
Valor predictivo negativo	87,40 %	83,7 % - 90,5 %
Proporción de probabilidad positiva	6,96	-
Proporción de probabilidad negativa	0,39	-

CI = intervalo de confianza

13 LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

- La interpretación de los resultados de ScreenYu Gyn® se debe realizar siempre en conjunción con los resultados de otros procedimientos diagnósticos de laboratorio y teniendo en cuenta también el cuadro clínico.
- Para evitar resultados erróneos, hay que respetar las especificaciones según las instrucciones de uso, por ejemplo los volúmenes de pipeteo, los tiempos de incubación, las temperaturas y los pasos de preparación.
- La toma de muestras y el almacenamiento adecuados son aspectos fundamentales para los resultados de las pruebas.
- En principio, en los procedimientos de las pruebas biológicas moleculares no se puede descartar que otras variantes de secuencia muy poco frecuentes puedan influir en el resultado de la prueba y que aún no estén contempladas en las fuentes consultadas para el análisis de la especificidad y la sensibilidad de los cebadores y las sondas.
- El funcionamiento de los instrumentos fuera de las especificaciones, así como las desviaciones del procedimiento de prueba descrito, las condiciones de almacenamiento especificadas, los materiales, el equipo o el material de muestra recomendado, puede dar lugar a diferencias con respecto a los resultados que se obtienen al cumplir todas las especificaciones.
- Los controles internos y externos proporcionados sirven como ayuda para la detección de fallos. Sin embargo, no son capaces de detectar todos los fallos posibles. Es responsabilidad del usuario validar cualquier modificación realizada o, si procede, los dispositivos utilizados y garantizar el cumplimiento de las especificaciones del dispositivo.

14 REFERENCIAS

- [1] Sung, H. et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71(3):209-249
- [2] Walboomers, J. et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189(1):12-19
- [3] Cuzick et al. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 119(5):1095-1101
- [4] Hansel et al. (2014). A Promising DNA Methylation Signature for the Triage of High-Risk Human Papillomavirus DNA-Positive Women. *PLOS ONE.* Volumen 9, número 3, e91905
- [5] Schmitz et al. (2017). Performance of a methylation specific real-time PCR assay as a triage test for HPV-positive women. *Clinical Epigenetics.* 9:118
- [6] Schmitz et al. (2018). Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer.* 18:1197
- [7] Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (2008). Directrices europeas para la garantía de calidad en el cribado del cáncer de cuello uterino (segunda edición)

15 RESPONSABILIDAD

El ScreenYu Gyn® Kit solo se puede utilizar para su finalidad prevista. Epitype GmbH no asume ninguna responsabilidad por cualquier otro uso (por ejemplo, en caso de incumplimiento de estas instrucciones o de un uso inadecuado) y cualquier daño resultante.

16 PREGUNTAS Y PROBLEMAS

Si tiene alguna pregunta o si experimenta algún problema con el producto, póngase en contacto con su representante de Epitype GmbH.

Puede ponerse en contacto con el servicio técnico de Epitype GmbH de lunes a viernes entre las 8:00 y las 16:00 h llamando al siguiente número de teléfono: +49 (0) 3641 5548500

Fuera del horario de oficina, envíenos un correo electrónico a: support@epitype.de

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden (Alemania)

Directores gerentes: Dr. Alfred Hansel, Dra. Martina Schmitz, Dr. Timm Zörgiebel

17 NOTAS ADICIONALES

- Aviso reglamentario para los clientes de la Unión Europea: tenga en cuenta su obligación de informar a su autoridad competente y a Epitype GmbH sobre cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto.
- La versión actual de la ficha de datos de seguridad de este producto se encuentra en el centro de descargas de la página web (<https://www.epitype.de/downloadcenter/>) o se puede solicitar por correo electrónico a **support@epitype.de**.

18 SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
PCR-MM	Mastermix		Temperatura de almacenamiento
STRIPS	Tiras de PCR		Si no se ha abierto, utilizar hasta (AAAA-MM-DD)
CAPS	Tapones		Contenido suficiente para <n> pruebas
CONTROL+	Control positivo		Fabricante
H₂O	Agua		Seguir las instrucciones de uso
IVD	Diagnóstico <i>in vitro</i>		Proteger de la luz solar
LOT	Denominación del lote		No reutilizar
REF	Número de referencia		Marcado CE

19 LISTA DE CAMBIOS

Versión anterior (Fecha de publicación)	Cambios
	La revisión 8 de IFU es la primera versión traducida al español.

20 PROTOCOLO BREVE

A continuación encontrará una plantilla de guía rápida en forma de lista de verificación. Antes de utilizar la guía de inicio rápido, lea detenidamente las instrucciones de uso descritas detalladamente en el capítulo 11, incluidas todas las notas. El kit de bisulfito no está incluido en el ScreenYu Gyn® Kit. El tratamiento con bisulfito de las muestras se debe realizar utilizando el EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD) (véase el capítulo 7 para obtener información de referencia).

Preparación de las muestras

- Agite en vórtex las muestras de pacientes durante 5 segundos a velocidad máxima y transfiera 1 ml a un tubo de reacción de 1,5 ml
- Centrifugue las muestras durante 5 minutos a 10 000 xg
- Retire y deseche 900 µl de sobrenadante por encima del precipitado

Tratamiento de las muestras con bisulfito

- Prepare el EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante
- Resuspenda el precipitado
- Configure la reacción en un tubo de reacción de 0,5 ml, agite en vórtex y centrifugue

Reacción para la conversión del bisulfito

Componente	Por reacción
Lightning Conversion Reagent	130 µl
Muestra resuspendida	20 µl
Volumen total	150 µl

- Realice el tratamiento con bisulfito según las instrucciones del fabricante del EZ DNA Methylation-Lightning Kit y sega los pasos adicionales:
- Desechar el flujo después del último paso de lavado
- Centrifugar la columna en el tubo de recogida vacío durante 1 minuto a máxima velocidad para secarla completamente
- Transfiera la columna a un tubo de reacción de 1,5 ml
- Pipetee 15 µl de M-Elution Buffer sobre la columna y centrifugue a 8000 xg durante 30 segundos

Preparación y pipeteo de la PCR

- Centrifugue la muestra
- Agite en vórtex y centrifugue ScreenYu Gyn® Mastermix
- Retire las tapas de PCR de las ScreenYu Gyn® Strips y deséchelas
- Pipetee 10 µl de ScreenYu Gyn® Mastermix por cada pocillo
- Pipetee 10 µl de muestra o de ScreenYu Gyn® Positive Control (en el pocillo A1) o de ScreenYu Gyn® Water (en el pocillo B1)
- Cierre las ScreenYu Gyn® Strips con los ScreenYu Gyn® Caps sin usar (bolsa transparente)
- Agite en vórtex y centrifugue las ScreenYu Gyn® Strips

Realización de la PCR

- Encienda el dispositivo de PCR en tiempo real, abra el software si es necesario y seleccione la plantilla ScreenYu Gyn
- Designe la ejecución de PCR con un nombre individualizado, edite la disposición de placa y compruebe el perfil de temperatura

Protocolo de temperatura de PCR

Programme Name	Number of Cycles	Temperature	Time (m:ss)
Initialization	1 x	94 °C	1:00
Amplification	42 x	94 °C	0:15
		61 °C	0:30
Cooling	1 x	37 °C (cotas z 480 Analyzer) 30 °C (CFX96 Real-Time PCR Detection System)	1:00

- Coloque las ScreenYu Gyn® Strips en el dispositivo e inicie la ejecución de PCR

Análisis e interpretación de los datos de PCR

- Abra el archivo exportado y fusione los datos en un programa de hoja de cálculo adecuado
- Formatee los datos de modo que los resultados de las distintas muestras se presenten uno debajo del otro y los marcadores ZNF671 y ACTB se presenten uno al lado del otro
- Compruebe los resultados del control positivo y del control negativo para ambos marcadores
- Analice el resultado de las muestras recogidas

Una muestra se considera positiva en el ensayo ScreenYu Gyn® cuando se cumplen los siguientes criterios:

Criterios de validez y positividad

Dispositivo de PCR	Marcador	Valor Ct	ΔCt ZNF671 - ACTB
cobas z 480 Analyzer	ACTB	≥ 20, ≤ 32	-
	ZNF671	≥ 20, ≤ 42	≤ 9,00
CFX96 Real-Time PCR Detection System	ACTB	≥ 20, ≤ 32	-
	ZNF671	≥ 20, ≤ 42	≤ 10,00

Un resultado positivo de la prueba ScreenYu Gyn® se asocia con la presencia de una neoplasia intraepitelial cervical o un cáncer de cuello uterino. ScreenYu Gyn® no se debe considerar como la decisión terapéutica definitiva, sino que se debe analizar junto con otros hallazgos médicos.