



GynTect®

Grunnleggende UDI-DI: 426076785GYNTECTYM

Bruksanvisning

REF



UDI-DI

GT003-06

6 prøver

4260767851017

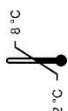
GT003-10

10 prøver

4260767851116



Les disse instruksjonene nøye før du utfører GynTect®-testen. Følg instruksjonene nøye for å sikre pålitelige testresultater.



GynTect® er et in vitro diagnostisk kit for kvalitativ påvisning av seks epigenetiske markører i bisulfit-konvertert DNA fra livmorhalsprøver fra kvinner med positiv HPV-test eller uklart Pap-testresultat. Et positivt GynTect®-testresultat korrelerer til tilstedeværelse av cervical intraepitelial neoplasie eller livmorhalskreft.



Kun for in vitro-diagnostisk bruk (IVD) av kvalifisert personell.

Revisjons 7 (2025-09)
Oversettelse utgitt 2026-01

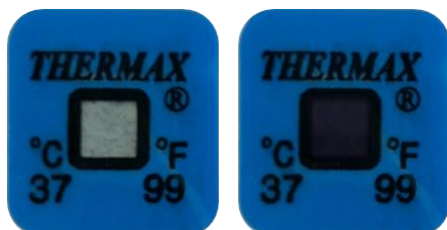


Epitype GmbH
Moritzburger Weg 67 • 01109 Dresden
Deutschland (Tyskland)
Telefon: +49 (0) 3641 5548500
contact@epitype.de • www.epitype.de



FRAKT OG OPPBEVARING

GynTect® Kit sendes ved romtemperatur. Temperaturgrensen overvåkes av et temperaturmålepunkt. Kontroller målepunktet umiddelbart etter at kittet er mottatt for å se om det er fargeendringer (se Figur 1), og sjekk at sekundæremballasjen, forseglingen og primæremballasjen er uskadet. Ved mottak må kittet umiddelbart kjøles ned til 2 °C til 8 °C og beskyttes mot lys. Riktig forsendelse og passende lagring gjør det mulig å bruke GynTect® Kit og alle dets komponenter frem til den angitte utløpsdatoen.



Figur 1 Overvåking av transporttemperaturen

Temperaturmålepunktet på GynTect® Kit gjør det mulig å overvåke temperaturen under transport. Den lyse sølvfargede firkanten i midten av punktet indikerer at temperaturen under transport ikke har overskredet den tillatte transporttemperaturen. En svart firkant indikerer derimot at den tillatte temperaturen har blitt overskredet under transport. Ytelsesegenskapene til GynTect® Kit kan ikke lenger garanteres. I dette tilfellet må du kontakte Epitype GmbH.

INNHALDSFORTEGNELSE

1.	Tiltenkt Formål	5
2.	Klinisk betydning	5
3.	Prinsippet bak testen	5
4.	Utforming av GynTect®-analysen	7
4.1.	GynTect® Strips layout	7
4.2.	Kontroller.....	7
4.2.1.	Kvalitetskontroll bisulfittbehandling (ACHE).....	7
4.2.2.	Kvalitetskontroll metylering (IDS-M).....	8
4.2.3.	Positiv kontroll	8
4.2.4.	Negativ kontroll	8
5.	Referansemateriale.....	8
6.	Innhold i settet	8
7.	Forbruksvarer og utstyr (ikke inkludert i settet).....	9
8.	Oppbevaring og holdbarhet	10
9.	Sikkerhetsinstruksjoner	10
9.1.	Generell informasjon.....	10
9.2.	Romlig inndeling	11
9.3.	Unngå forurensning	12
9.4.	Håndteringsinstruksjoner.....	12
10.	Avfall.....	12
11.	GynTect®- prosedyre	13
11.1.	Tidsplan for arbeidsflyten	13
11.2.	Prøvetaking.....	13
11.3.	Prøveforberedelse.....	14

11.4.	Bisulfittbehandling av prøvene.....	14
11.4.1.	Bisulfittkonvertering av DNA	14
11.4.2.	Rensing av det konverterte DNA.....	16
11.5.	PCR	17
11.5.1.	Forberedelse og pipettering av PCR	17
11.5.2.	Utføring av PCR på cobas z 480 Analyzer	19
11.5.3.	Utførelse av PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems	22
11.6.	Evaluering og tolkning av PCR-data	25
12.	Ytelse av GynTect®	28
12.1.	Analytisk ytelse	28
12.1.1.	Analytisk følsomhets – påvisning av metylert DNA	28
12.1.2.	Analytisk spesifisitet – påvisning av umetylert DNA.....	29
12.2.	Presisjon	30
12.2.1.	Repeterbarhet.....	30
12.2.2.	Reproducerbarhet	30
12.3.	Robusthet	30
12.4.	Klinisk ytelse	31
13.	Begrensninger ved prosedyren.....	32
14.	Referanser.....	32
15.	Ansvar.....	33
16.	Spørsmål og problemer.....	33
17.	Tilleggsmerknader	34
18.	Betydningen av symbolene på	34
19.	Liste over endringer	35
20.	Kort protokoll.....	35

1. TILTENKT FORMÅL

GynTect® er et in vitro diagnostisk kit for kvalitativ påvisning av seks epigenetiske markører i bisulfit-konvertert DNA fra livmorhalsprøver fra kvinner med positiv HPV-test eller uklart Pap-testresultat. Et positivt GynTect®-testresultat korrelerer til tilstedeværelse av cervical intraepitelial neoplasia eller livmorhalskreft.

GynTect® er kun beregnet for bruk av kvalifisert personell som er kjent med molekylærbiologiske teknikker.

2. KLINISK BETYDNING

Livmorhalskreft er den fjerde vanligste kreftformen hos kvinner over hele verden, med over 600 000 nye tilfeller hvert år [1]. I nesten alle tilfeller av livmorhalskreft observeres vedvarende infeksjon med et høyrisiko humant papillomavirus [2], noe som viser at infeksjon med HPV er en forutsetning for utvikling av livmorhalskreft. Kvinner som tester negativt for HPV har en ekstremt lav risiko for å utvikle livmorhalskreft. Imidlertid utvikler de fleste kvinner som tester positivt for HPV heller ikke forstadier til kreft eller kreft. Bare ca. 15 % av kvinnene som er smittet med HPV kan utvikle slike forstadier til livmorhalskreft eller karsinom som krever behandling [3].

Pasienter med positivt HPV-testresultat eller uklare Pap-testresultater (Pap II, Pap III og Pap IIID1 og D2) kan få anbefalt å ta en triagetest som GynTect® for å fastslå sannsynligheten for livmorhalskreft med høy nøyaktighet.

GynTect®-resultatet bør ikke brukes til endelig behandlingsbeslutning, men må vurderes i kombinasjon med andre kliniske funn.

3. PRINSIPPET BAK TESTEN

GynTect® er basert på påvisning av epigenetiske biomarkører, nærmere bestemt metyleringer av spesifikke DNA-regioner, som korrelerer med forekomsten av forstadier til kreft eller livmorhalskreft [4, 5, 6]. I tillegg analyseres en bisulfit-spesifikk og en metyleringsspesifikk referansemarkør. Markørregionene som brukes i GynTect® er oppført i Tabell 1.

Tabell 1 Oversikt over GynTect®-markørregionene

Betegnelse i protokoll	Markørregion (gennavn)
Metyleringsmarkør	ASTN ₁
	DLX ₁
	ITGA ₄
	RXFP ₃
	SOX ₁₇
	ZNF6 ₇₁
Kontrollmarkør	ACHE
	IDS

Markørdeteksjonen utføres ved hjelp av svært følsom realtids-PCR. Resultatet fra realtidsinstrumentene er Cp-verdien (krysspunkt, cobas z 480 Analyzer) eller Cq-verdien (syklusquantifisering, CFX96 Real-Time PCR Detection Systems), som begge tilsvarer syklusterskelverdien Ct og også refereres til som sådan nedenfor. Denne verdien tilsvarer syklusen i en realtids-PCR der fluorescensen stiger over en definert terskelverdi for første gang.

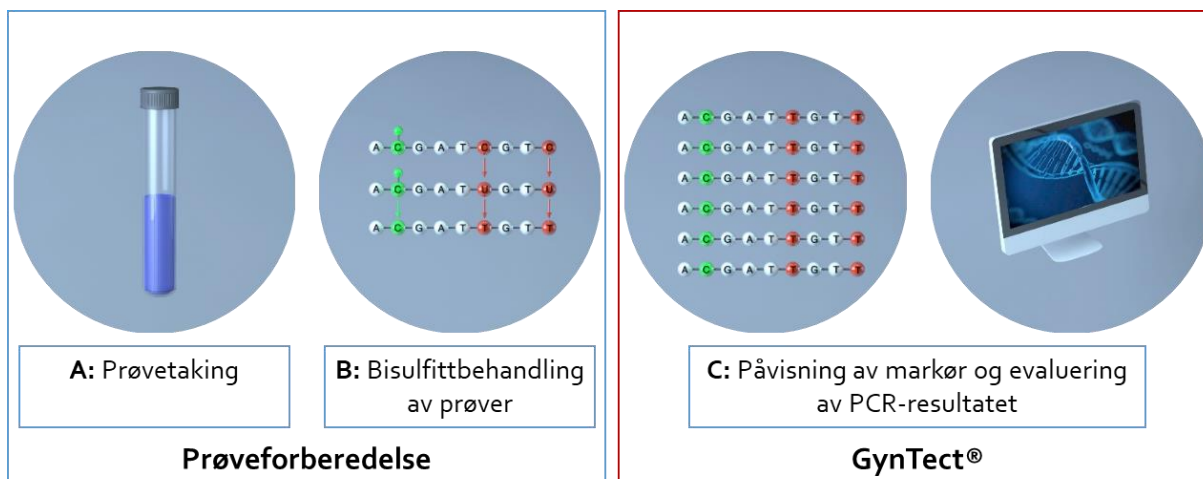
Analyse av en pasientprøve med GynTect® består av to trinn.

Først behandles DNA-et i livmorhalsprøven med en bisulfittreaksjon, som fører til en «fiksering» av DNA-metyleringen. For rensing etter bisulfittkonvertering anbefaler vi en kortere og forenklet protokoll. Etter eluering fortynnes DNA-et med vann. I det andre trinnet analyseres det bisulfittkonverterte DNA-et ved hjelp av åtte singleplex metyleringsspesifikke realtime PCR-reaksjoner. De opprinnelig metylerte DNA-regionene forsterkes selektivt ved hjelp av primere som plasseres i rørene i en PCR-stripe med åtte rør.

Realtidsdeteksjon av metyleringsmarkøren og kontrollregionene utføres ved hjelp av et interkalerende fluorescerende fargestoff. I tillegg utføres en positiv og negativ kontroll for å kontrollere PCR. Deretter utføres den assay-spesifikke analysen.

Prøvetaking og bisulfitt-sett er ikke en del av GynTect® Kit. Spesielle produkter for prøvetaking og bisulfittbehandling er tilgjengelige separat.

Testprinsippet er vist i Figur 2.



Figur 2 Testprinsipp

A: Gynekologen tar en celleprøve fra livmorhalsen til pasienten, som overføres til prøvemediet.

B: Diagnostikklaboratoriet utfører bisulfittkonvertering av pasientprøven.

C: For hver prøve utføres åtte singleplex PCR-reaksjoner. Evalueringen oppnås ved påvisning av det interkalerende fluorescerende fargestoffet som finnes i mastermiksen og definerte smeltekurvetopper.

4. UTFORMING AV GYNTECT®-ANALYSEN

4.1. GynTect® Strips layout

Hver GynTect® Strip inneholder åtte primerpar for amplifisering av seks metyleringsspesifikke markører og to kontrollmarkører. Oppsettet av GynTect® Strips er vist i Figur 3.

Det kreves en komplett GynTect® Strip for analyse av en enkelt pasientprøve.



Figur 3 Layout av GynTect® Strips

Hver posisjon 1–6 på PCR-stripene inneholder primeren for en av seks metyleringsspesifikke markører. Posisjon 7 på stripene inneholder primerne for bisulfittkvalitetskontroll (ACHE), posisjon 8 primerne for metyleringskvalitetskontroll (IDS-M).

4.2. Kontroller

GynTect® Kit inneholder flere kontroller. Disse kontrollene gjør det mulig å overvåke kritiske trinn i testen, inkludert prøve kvalitet og bisulfittbehandling (ACHE), metyleringsstatus for prøven (IDS-M) og kvaliteten på PCR-reaksjonene.

4.2.1. Kvalitetskontroll bisulfittbehandling (ACHE)

Denne kontrollmarkøren verifiserer vellykket konvertering av alle ikke-metylerte cytosinrester til uracil og dermed kvaliteten på bisulfittbehandlingen. For dette formålet amplifiseres et DNA-område lokalisert ved humant acetylkolinesterase (ACHE). Utilstrekkelig ACHE-amplifisering indikerer at analysen er ugyldig og må gjentas.

4.2.2. Kvalitetskontroll metylering (IDS-M)

Denne kontrollen tillater amplifisering av det imprintede genet IDS, som er metylert på det andre kvinnelige X-kromosomet (IDS-M). Hvis en Cp-verdi mellom 20 og 32 genereres i PCR-reaksjonen, er livmorhalsprøven gyldig. Hvis det ikke oppnås amplifisering, må analysen vurderes som ugyldig og må gjentas.

4.2.3. Positiv kontroll

Det følger med en kontrollmal for overvåking av kvaliteten på PCR-reaksjonen. Under amplifisering av kontrollmalen GynTect® Positive Control (PC) skal hver av de åtte markørene gi en Cp-verdi under 38. Ellers er PCR-reaksjonene ugyldige og må gjentas.

4.2.4. Negativ kontroll

Som negativ kontroll utføres reaksjoner med malen GynTect® Water (NTC – No Template Control). Disse reaksjonene skal være negative for alle markører. Hvis det oppstår spesifikke reaksjonsprodukter i noen av reaksjonene, kan det ha oppstått forurensninger, og GynTect® må gjentas.

5. REFERANSEMATERIALE

Det er ikke tilgjengelig noe internasjonalt referansemateriale.

6. INNHOLD I SETTET

Tabell 2 Innhold i GynTect® Kit

Komponent	Symbol	Innhold	Volum/mengde	
			GT003-06	GT003-10
GynTect® Mastermix	PCR-MM	2 x PCR-masterblanding ¹	1 x 1,1 ml	1 x 1,1 ml
GynTect® Strips	STRIPS	PCR-strips ² for pasientprøver (grønne lokk)	6 strips	10 strips
		PCR-strips ² for positive kontroller (røde lokk)	3 strips	1 stripe
		PCR-strips ² for negative kontroller (gule lokk)	3 strips	1 stripe
GynTect® Caps	CAPS	Lokk til stripe	12 cap-strips	12 cap-strips
GynTect® Positive Control	CONTROL+	Positiv kontroll	1 x 260 µl	1 x 90 µl
GynTect® Water	H ₂ O	Vann	1 x 2 ml	1 x 2 ml
Bruksanvisning	-	Bruksanvisning	1	1

¹ Inneholder alle komponenter som kreves for polymerasekjedereaksjon (PCR), unntatt primer og mal.

² Inneholder primerne som kreves for PCR.

7. FORBRUKSVARER OG UTSTYR (IKKE INKLUDERT I SETTET)

GynTect® kan kun utføres ved bruk av oppført materiale og utstyr, og kun av kvalifisert personell. Alt laboratorieutstyr må installeres, vedlikeholdes, håndteres og kalibreres i henhold til produsentens instruksjoner.

Romtemperatur er definert som temperatur mellom 15 °C og 30 °C.

Tabell 3 Nødvendig utstyr

Utstyr	Katalognr.	Bestill
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) *	Z102	order@epitype.de
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	-	via Hologic Inc.
Cervex-Brush® eller Cervex-Brush® Combi	-	via Rovers Medical Devices

* EpiTect® **Fast** Bisulfite Kit (katalognummer QIAGEN: 59802) må ikke forveksles med EpiTect® Bisulfite Kit!

Følgende laboratorieutstyr og forbruksvarer er nødvendige for å utføre GynTect®-analysen.

- Sentrifuge for 0,5 ml/1,5 ml reaksjonsrør, $\geq 10\,000\,xg$
- Sentrifuge for PCR-strips
- Termocyklator for 0,5 ml reaksjonsrør
- Vortex-mikser/ryster
- Pipetter med forskjellige volumområder og tilhørende filterspisser (sterile, DNase-frie)
- Reaksjonsrør for 0,5 ml/1,5 ml (DNase-frie)
- Reaksjonsrørstativ for 0,5 ml/1,5 ml reaksjonsrør
- Etanol 96–100 %, udenaturert
- Realtids-PCR-apparat, deteksjonskanal for FAM/SYBR Green

GynTect® er validert på:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) med 96-brønnsblokk, adapter for PCR-strips og LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0 (Service Pack 3), evaluering med versjon 1.5.1.62
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) med CFX Maestro-programvare versjon 2.3
- CFX Opus 96 (Dx) Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) med CFX Maestro-programvare versjon 2.3

8. OPPBEVARING OG HOLDBARHET

Hvis GynTect® Kit og dets komponenter transporteres og oppbevares på riktig måte, kan de brukes frem til angitt dato. Alle reagenser i kitet er stabile frem til angitt utløpsdato etter åpning, hvis de oppbevares under angitte forhold og beskyttes mot forurensning (se Tabell 4).

Tabell 4 Oppbevaringstemperatur for GynTect® Kit og utstyr som ikke er inkludert i settet

Utstyr	Oppbevaringstemperatur
GynTect® Kit	2 °C til 8 °C
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) unntatt fra	15 °C til 25 °C
Spin Columns, DNA Protect Buffer, Buffer BD	2 °C til 8 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C til 30 °C
Cervex-Brush® eller Cervex-Brush® Combi	15 °C til 30 °C

9. SIKKERHETSINSTRUKSJONER

9.1. Generell informasjon

Ved etablering av moderne molekylærbiologiske metoder må instruksjonene nedenfor følges nøye for å sikre maksimal sikkerhet for laboratoriepersonell og for å oppnå resultater av høy kvalitet:

- Da dette kit omfatter molekylærbiologiske prosesser, som bisulfittbehandling, amplifikasjon og påvisning av DNA, er det kun beregnet for in vitro-diagnostikk og skal kun brukes av personell som er opplært i laboratoriepraksis for in vitro-diagnostikk.
- Les bruksanvisningen nøye før du bruker produktet. Kun den gjeldende versjonen skal tas i betraktning.
- Bruk egnet laboratoriefrakk, engangshansker og, om nødvendig, vernebriller for hvert trinn.
- Unngå direkte kontakt med de biologiske prøvene, samt spruting eller sprøyting av prøvene.
- Det oppvarmede lokket og inkubasjonsblokken på termocyklatoren kan nå temperaturer på opptil 110 °C. Det er fare for brannskader på huden. Følg bruksanvisningen til enheten.
- Vask hendene grundig etter håndtering av prøver og reagenser.
- Ikke bruk GynTect® hvis reagentemballasjen er skadet. Kontakt distributøren din.
- Ikke bruk GynTect® Kit etter utløpsdatoen, og ikke bruk utgåtte reagenser.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige partier, og ikke bland reagenser fra settet med reagenser fra andre produsenter.
- Bruk kun materialer som følger med kittet eller som er anbefalt av produsenten.
- Alt nødvendig laboratorieutstyr må installeres, kalibreres, håndteres og vedlikeholdes i henhold til produsentens instruksjoner.

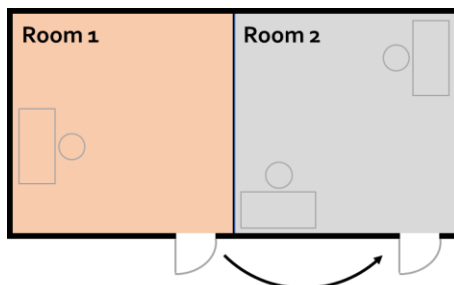
- Pipettering av små væskemengder i mikroliterområdet krever øvelse. Sørg for at du pipetterer de nødvendige volumene med mikropipetter så nøyaktig som mulig.
- Gjeldende regulatoriske krav for operatøren må overholdes.
- Det forutsettes at god laboratoriepraksis (GLP) som beskrevet for eksempel av U.S. Food and Drug Administration (FDA) eller Organisasjonen for økonomisk samarbeid og utvikling (OECD) overholdes. Spesielt bør anbefalinger for utførelse av molekylær amplifikasjonstesting tas i betraktning.
- Korrekt funksjon av PCR-apparatene er kun garantert ved romtemperatur.

9.2. Anbefalt arbeidsflyt

På grunn av PCRs høye analytiske følsomhet bør det utvises stor forsiktighet for å opprettholde renheten til kitkomponentene og prøvene.

PCR multipliserer deler av DNA-et i prøven millioner til milliarder av ganger. Selv de minste mengder av disse PCR-produktene (f.eks. også spredt som aerosol) kan føre til falske resultater hvis de overføres til prøvematerialet, til reagensene for bisulfittbehandling eller til PCR-reagensene i dette kittet.

En ren og godt strukturert arbeidsflyt er derfor avgjørende for å forhindre feilaktige resultater. For dette formålet er det nødvendig å skille laboratorieområdene for pre-PCR og post-PCR fra hverandre. Det bør være separat utstyr, forbruksvarer, laboratoriefrakker og hansker tilgjengelig i hvert område. Overfør aldri laboratoriefrakker, hansker eller utstyr fra ett område til et annet. Figur 4 viser et eksempel på et laboratorium delt inn i to separate rom. Det ene området er kun beregnet på bisulfittbehandling og forberedelse av PCR, mens PCR utføres i det andre området.



Figur 4 Romlig inndeling

I rom 1 utføres bisulfittbehandling og PCR-forberedelse (optimalt: bruk en PCR-hette). I rom 2 utføres PCR-kjøringen, markørene detekteres og resultatene analyseres.

9.3. Unngå forurensning

- Laboratoriefrakker og engangshansker må brukes under alle trinn.
- Engangshansker bør skiftes ofte og alltid etter (mistenkt) kontaminering med reagenser eller prøvemateriale.
- Alle overflater, utstyr og forsyninger må dekontamineres med en egnet rengjøringsløsning (DNA-ødeleggende midler).
- Ikke berør innsiden av reaksjonsrørene eller lokkene.
- Ved pipettering må det alltid brukes filterspisser (uten DNase, RNase og humant DNA) for å unngå krysskontaminering via aerosoler som dannes under pipetteringen. Spissene bør alltid skiftes mellom pipetteringstrinnene.
- Det er viktig å utføre negative kontroller for å oppdage mulig kontaminering.

9.4. Håndteringsinstruksjoner

- Oppbevar ubrukte komponenter i originalemballasjen inntil de skal brukes.
- Alle sentrifugeringstrinn skal utføres ved romtemperatur.
- Arbeidsflyten kan avbrytes etter bisulfittbehandlingen. På dette tidspunktet kan prøvene oppbevares i en uke ved 2 °C til 8 °C eller opptil to måneder ved -15 °C til -30 °C.
- Berør aldri innsiden av de fargede PCR-stripekapslene når du fjerner dem fra stripene, og kast dem på en forsvarlig måte.
- GynTect® Strips og GynTect® Caps skal ikke berøres uten engangshansker under hele prosedyren, da det ellers kan oppstå uspesifikke fluorescenssignaler.
- Merking av GynTect®-striper og GynTect®-hetter på feil steder kan gi uspesifikke fluorescenssignaler under PCR-kjøringene.
- GynTect® Strips og GynTect® Caps er beregnet for engangsbruk og kan ikke gjenbrukes.
- Oppbevar ubrukte GynTect® Strips og GynTect® Caps i originalemballasjen.

10. AVFALL

Ubenyttet GynTect® Kit og dets komponenter kan kastes uten ytterligere spesielle forholdsregler. Pasientprøver og brukte reaksjonsrør må håndteres som smittefarlig avfall. Alle reagenser må kastes i henhold til lovbestemte forskrifter.

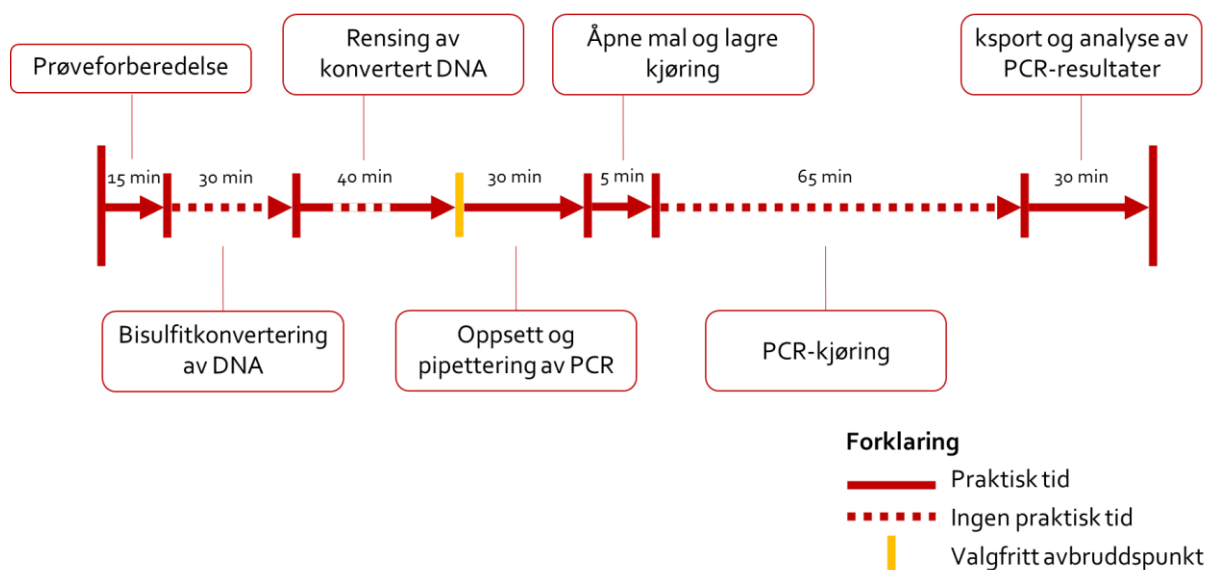
11. GYNTECT®- PROSEDYRE

Følgende kapittel inneholder en detaljert beskrivelse av de ulike behandlingstrinnene, fra prøvetaking til analyse av dataene. GynTect® Kit GT003-10 inneholder én positiv og én negativ kontroll for hver enkelt GynTect®-kjøring. Alle ti prøvene må brukes i én arbeidsflyt.

11.1. Tidsplan for arbeidsflyten

Totalt kan GynTect® behandles på mindre enn 4 timer, med en aktiv håndteringstid på ca. 2 timer. Før du utfører den første GynTect®-analysen, bør du sette av ca. 15 minutter til å sette opp et PCR-malprogram for analysen.

Figur 5 viser detaljene i arbeidsflyten.



Figur 5 Tidsplan for GynTect®-arbeidsflyten

11.2. Prøvetaking

Prøvetakingssettet og bisulfitsettet er ikke en del av GynTect® Kit. ThinPrep® PreservCyt® Solution (Hologic) og Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) kan kjøpes fra de respektive produsentene. Innsamling av livmorhalsprøve av legen skal utføres i henhold til produsentens instruksjoner og i samsvar med allment aksepterte retningslinjer for innsamling av livmorhalsprøve [7].

Viktig: Børsten må kastes etter prøvetaking og skal ikke forbli i prøvemediet, da dette vil påvirke ytelsen til GynTect®.

ThinPrep® PreservCyt® Solution må brukes som utstrykmedium. Bruk av andre prøvemedier var ikke en del av valideringen av GynTect®-analysen.

Det er viktig å sikre at DNA-prøven er av god kvalitet for at analysen skal være gyldig. Feil prøvetaking, bisulfitbehandling og DNA-lagring kan føre til ugyldige eller til og med falske negative resultater.

Livmorhalsprøver kan transporteres til laboratoriet for testing uten kjøling. Prøver kan lagres i opptil 1,5 år ved en temperatur mellom 2 °C til 30 °C.

11.3. Prøveforberedelse

Følgende trinn må utføres i prøveforberedelsesområdet (rom 1).

Viktig: Børsten må kastes før prøven behandles, hvis børsten fortsatt er plassert i prøveflasken.

1. Vortexer en pasientprøve i 5 sekunder på maksimal hastighet og overfør umiddelbart 1 ml av prøven til et 1,5 ml rør.

Oppmerksomhet: Cellene vil raskt legge seg på bunnen av flasken. Pasientprøven må brukes innen 10 sekunder etter blanding.

2. Sentrifuger prøven i 5 minutter ved 10 000 xg.
3. Fjern forsiktig 900 µl supernatant over pellet. Ikke fjern eller ødelegg pellet.

Oppmerksomhet: Pelleten er mer eller mindre fast, avhengig av prøven.

4. Vortex pellet i 3 sekunder for å resuspendere. 40 µl resuspendert prøve brukes til bisulfittbehandling.

11.4. Bisulfittbehandling av prøvene

Bisulfitt-settet er ikke en del av GynTect® Kit. GynTect® ble validert med EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen).

Oppmerksomhet: Den opprinnelige protokollen for EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen) fra er endret. Bruk av denne endrede protokollen er en forutsetning for å oppfylle de angitte ytelsesparametrene.

11.4.1. Bisulfittkonvertering av DNA

1. Forbered buffere fra bisulfitt-settet som skal brukes i henhold til Tabell 5.

Viktig: Buffer BL brukes uten *Carrier RNA*. Når Buffer BL oppbevares eller transporteres ved lave temperaturer, kan det dannes utfellinger. I dette tilfellet løses utfellingene ved forsiktig oppvarming (37 °C) og risting av Buffer BL.

Tabell 5 Buffer for EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Buffer	Tilsetning av etanol	Oppbevaringstemperatur
Buffer BL *	-	Romtemperatur
Buffer BW	30 ml etanol (96 - 100 %)	Romtemperatur
Buffer BD	27 ml etanol (96 - 100 %)	2 °C til 8 °C

* Ikke tilsett *Carrier RNA*, kvalitetskontroll (se merknad)

2. For hver prøve sett opp en bisulfittbehandlingsreaksjonsblanding ved hjelp av 0,5 ml rør i henhold til Tabell 6.

Viktig: Når Bisulfite Solution oppbevares eller transporteres ved lave temperaturer, kan det dannes utfellinger. I så fall løser du utfellingene ved å varme opp (37 °C) og riste Bisulfite Solution forsiktig.

Tabell 6 Oppsett for bisulfittbehandling

Forbindelse	Per reaksjon
Bisulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Forberedt og resuspendert prøve	40 µl
Totalt volum per reaksjon	140 µl

* kvalitetskontroll (se merknad)

Oppmerksomhet: Bisulfite Solution kan ikke lagres. En **Bisulfite Solution** kan bare brukes til én prosess, rester må kastes.

3. Vortex reaksjonsblandingen for bisulfittkonvertering i 3 sekunder ved maksimal hastighet, sentrifuger den kort og la den stå ved romtemperatur inntil videre bruk.

Oppmerksomhet: DNA Protect Buffer endrer farge fra grønn til blå hvis blandingens pH er innenfor riktig område. Prøven må behandles innen 60 minutter.

4. Bruk en termisk thermosykler med oppvarmet lokk (100 °C) og programmer thermosykler i henhold til Tabell 7.

Viktig: Hvis termosykler ikke aksepterer et volum på opptil 140 µl, bruk neste mulige programmerbare volum. Lokket trenger ikke å forvarmes før konverteringen starter.

Tabell 7 Bisulfittkonvertering ved bruk av termocykulator

Trinn	Varighet	Temperatur
Denaturering	5 min	95 °C
Inkubasjon	10 min	60 °C
Denaturering	5 min	95 °C
Inkubasjon	10 min	60 °C
Reaksjonens slutt	Hold*	20 °C

*Konvertert DNA kan forbli i termocyklatoren eller oppbevares ved romtemperatur over natten (maks. 16 timer).

5. Plasser 0,5 ml-rørene i varmeblokken til termocyklatoren og start inkubasjonen.

Oppmerksomhet: Etter bisulfittkonvertering kan prøvene oppbevares over natten (maks. 16 timer) ved romtemperatur. Unngå oppbevaring i kjøleskap (ved temperaturer mellom 2 °C og 8 °C), da prøvene kan utfelle seg og hindre videre behandling.

11.4.2. Rensing av det konverterte DNA

6. Når bisulfittkonverteringen er fullført, vortex PCR-røret i 3 sekunder ved maksimal hastighet og sentrifuger kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.
7. Tilsett **310 µl Buffer BL** til hver MinElute® Spin Column.
Viktig: Merk MinElute® Spin Column tydelig.
8. Tilsett prøven (140 µl) til spin-kolonnen og bland kort ved å pipettere opp og ned 5 ganger.
Viktig: Ikke berør membranen i kolonnen med pipettespissen, og unngå dannelse av bobler. Sørg for at løsningen er homogen og fri for striper etter 5 x pipettering opp og ned.
9. Tilsett **250 µl etanol** (96 - 100 %) til hver spin-kolonne, lukk lokket og bland kort ved å snu kolonnen 5 ganger (180°).
10. Sentrifuger hver sentrifugeringskolonne i 30 sekunder ved 18 000 ×g og sørg for at væsken har passert kolonnen og kommet inn i oppsamlingsrøret.
11. Fjern sentrifugekolonnen fra sentrifugen, kast gjennomstrømningen og sett sentrifugekolonnen tilbake i oppsamlingsrøret.
12. For vask, tilsett **200 µl Buffer BW** til sentrifugeringskolonnen og sentrifuger i 30 sekunder ved 18 000 ×g.
13. Tilsett **200 µl Buffer BD** til hver sentrifugeringskolonne, lukk lokket og inkuber i 15 minutter ved romtemperatur (15 - 30 °C).
14. Når desulfoneringen er fullført, sentrifuger spinnkolonnen i 30 sekunder ved 18 000 ×g.
15. Tilsett **200 µl Buffer BW** og sentrifuger i 30 sekunder ved 18 000 ×g.
16. Fjern sentrifugekolonnen fra sentrifugen, kast gjennomstrømningen og sett sentrifugekolonnen tilbake i oppsamlingsrøret.
17. Vask sentrifugekolonnen med **400 µl Buffer BW** og sentrifuger i 30 sekunder ved 18 000 ×g.
18. Tilsett **200 µl etanol** (96 - 100 %) til hver sentrifugeringskolonne og sentrifuger i 30 sekunder ved 18 000 ×g.
19. Sett sentrifugekolonnen i et nytt 2 ml Collection-Tube og sentrifuger i 60 sekunder ved 18 000 ×g for å fjerne eventuell gjenværende væske.
Oppmerksomhet: Ikke hopp over dette trinnet, da resterende etanol kan svekke ytelsen til GynTect®-analysen.
20. Plasser sentrifugekolonnen i et rent 1,5 ml rør (ikke medfølgende), tilsett 20 µl vann direkte på midten av sentrifugekolonnens membran og lukk lokket forsiktig.
Viktig: Ikke skad spin-kolonnemembranen og ikke pipetter vannet på siden av spin-kolonnen.
21. Inkuber spin-kolonnen ved romtemperatur i 60 sekunder, og sentrifuger deretter spin-kolonnen i 60 sekunder ved 8 000 ×g (eluering).
22. Kontroller visuelt om eluatet har riktig volum.

Valgfritt: På dette stadiet kan prøvene oppbevares i opptil en uke ved 2 °C til 8 °C eller i opptil to måneder ved -15 °C til -30 °.

11.5. PCR

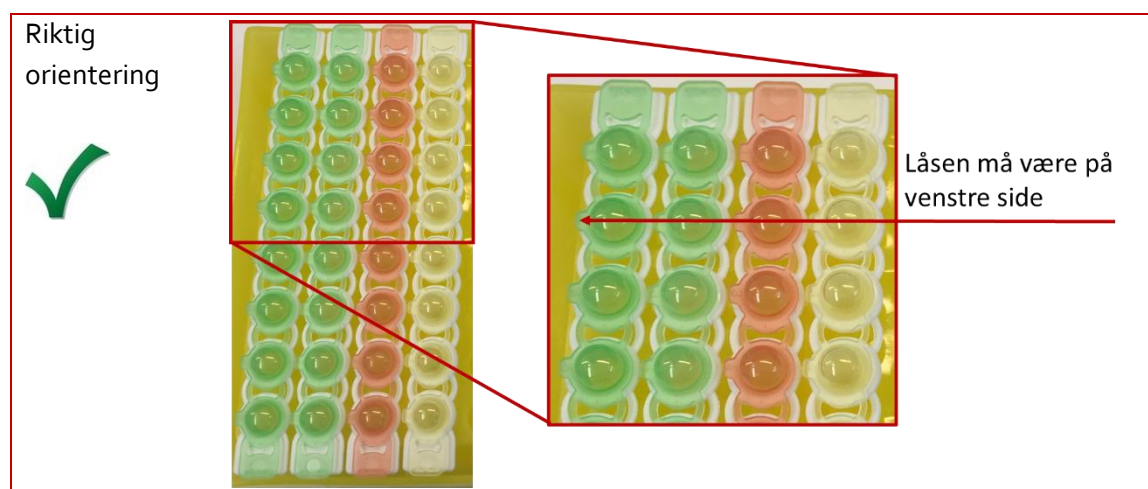
Før du starter PCR, må du kontrollere at PCR-temperaturprotokollen er programmert inn i det aktuelle realtids-PCR-apparatet for å minimere tiden mellom forberedelse og PCR-start. For å opprette PCR-programmet på cobas z 480 Analyzer, følg fremgangsmåten beskrevet på side 19. Forklaringen for PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems finnes på side 22 og videre.

11.5.1. Forberedelse og pipettering av PCR

Viktig: PCR-forberedelse og pipettering bør ikke ta mer enn 60 minutter. Dette trinnet utføres i rom 1 (pre-PCR-området).

Vær oppmerksom på plateoppsettet som er beskrevet på henholdsvis 20 eller 23. Den positive kontrollen (PC) må plasseres i rad 11 og den negative kontrollen (NTC) i rad 12.

1. Tilsett **70 µl GynTect® Water** til hver prøve.
2. Vortex prøvene i 3 sekunder på maksimal hastighet og sentrifuger dem kort.
3. Ta **GynTect® Mastermix** fra settet og bruk en **GynTect® Strip** (grønt lokk) for hver prøve og en **GynTect® Strip** (positiv kontroll: rødt lokk, negative kontroller: gult lokk) for hver kontroll.
4. Plasser **GynTect® Strips** på et PCR-stativ. Vær oppmerksom på orienteringen av **GynTect® Strips** (se Figur 6).



Figur 6 Retning av GynTect® Strips

5. Vortex **GynTect® Mastermix** i 3 sekunder på maksimal hastighet og sentrifuger kort.
6. Fjern de fargede og runde hettene fra **GynTect® Strip** og kast dem.
7. Tilsett **10 µl** av **GynTect® Mastermix** til hvert **GynTect® Strip-rør**.
Merk: Det oppstår en blå farge. Dette er en optisk inspeksjon og har ingen innvirkning på GynTect®-resultatet.
Viktig: Bytt tips for hvert strip-rør, siden **GynTect® Strips** allerede inneholder primere for PCR.
8. Tilsett **10 µl prøve** til hver av de åtte brønnene i **GynTect® Strips**.

Viktig: Bytt tips for hvert strip-rør.

Merk: Oppbevar resten av prøveeluatene for en gjentakelse av GynTect® PCR om nødvendig.

9. Lukk **GynTect® Strips** umiddelbart etter pipettering med flate, gjennomsiktige **GynTect® Caps**.

Oppmerksomhet: Unngå å berøre innsiden av **GynTect® Caps** og **GynTect® Strips**. Sørg for at **GynTect® Strips** er tett lukket. Inspeksjonen utføres best visuelt fra siden.

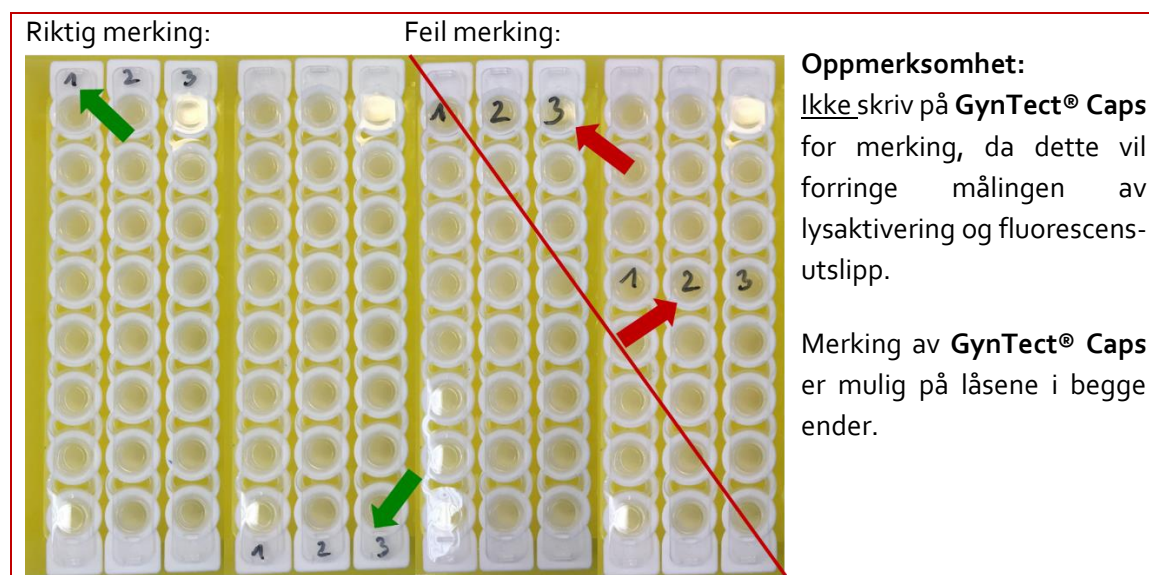
10. Vortex **GynTect® Positive Control** i 3 sekunder ved maksimal hastighet og sentrifuger den av.

11. Tilsett **10 µl GynTect® Positive Control** til hver av de åtte brønnene på **GynTect® Strip** for positiv kontroll, og **10 µl GynTect® Water** til hver av de åtte brønnene på **GynTect® Strip** for negativ kontroll.

12. Lukk **GynTect® Strips** umiddelbart etter pipettering med flate, gjennomsiktige **GynTect® Caps**.

Oppmerksomhet: Unngå å berøre innsiden av **GynTect® Caps** og **GynTect® Strips**. Sørg for at **GynTect® Strips** er tett lukket. Inspeksjonen utføres best visuelt fra siden.

13. Merk alle **GynTect® Strips** etter at du er ferdig med pipetteringen og lukkingen av de nye **GynTect® Caps**-låsene (se Figur 7).



Figur 7 Merking av GynTect® Strips

14. Vortex alle lukkede **GynTect® Strips** i 3 sekunder på maksimal hastighet og sentrifuger dem kort.

11.5.2. Utføring av PCR på cobas z 480 Analyzer

Følgende avsnitt beskriver hvordan du utfører GynTect® på realtids-PCR-systemene cobas z 480 Analyzer (merket med blått) og CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (merket med grønt). Følg imidlertid alltid produsentens instruksjoner for bruk av PCR-enheter.

PCR-en skal utføres i rom 2.

11.5.2.1. Opprette en PCR-mal

Hvis du har opprettet og lagret PCR-malen tidligere, kan du fortsette med 11.5.2.2 *Starte PCR-kjøringen*.

1. Slå på cobas z 480 Analyzer og datamaskinen. Innen 15 sekunder velger du «User defined Workflow» på dataskjermen i BIOS for å bytte til en fritt programmerbar enhetsmodus.
2. Velg *New Experiment* for å opprette en ny mal.
3. Sett *Detection Format* til SYBR Green 1 / HRM Dye og sett *Reaction Volume* til 20 µl. I fanen *Run Protocol* programmerer du temperaturprofilen i henhold til Tabell 8.

Tabell 8 PCR-temperaturprotokoll på cobas z 480 Analyzer

Program Name	Number of cycles	Analysis Mode	Target	Acquisition Mode	Hold (tt: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
			66 °C	Single	00:00:35	2,2
Melt curve	1 x	Melting Curves	95 °C	None	00:00:15	4,4
			60 °C	None	00:00:20	2,2
			95 °C	Continuous	-	0,11
Cooling	1 x	None	37 °C	None	00:01:00	2,2

4. Lagre *Run-Template* under navnet *GynTect*.

11.5.2.2. Starte PCR-kjøringen

Hvis du lagret PCR-malen tidligere, kan du nå få tilgang til den. Kontroller at riktig temperaturprotokoll er angitt.

1. Under *Subset Editor* genererer du det anbefalte plateoppsettet (se Figur 8 og Figur 9).

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

Figur 8 Eksempel på plateoppsett for seks prøver

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

Figur 9 Eksempel på plateoppsett for ti prøver ved bruk av GynTect® GT003-10

Viktig: Platelayouten er ikke variabel. Den positive kontrollen (PC) må plasseres i rad 11 og den negative kontrollen (NTC) i rad 12.

2. Definer prøvemerkingen under *Sample Editor*.
3. Plasser stripene vertikalt i PCR-enheten i den angitte rekkefølgen.

Viktig: Bruk adapteren for PCR-strips (kan bestilles fra Roche Diagnostics GmbH).

4. Lagre PCR-kjøringen ved å klikke på *disk*-knappen på ønsket sted med et tydelig navn, og start PCR-kjøringen ved å klikke på knappen *Start Run* i fanen *Run Protocol*.

11.5.2.3. Eksportere data

Hvis du analyserer PCR-kjøringen direkte på cobas z 480 Analyzer-datamaskinen, fortsett med 11.5.2.4

Når PCR-kjøringen er fullført (Run complete), eksporterer du PCR-kjøringen via  «Export» og lagrer filen på ønsket sted.

11.5.2.4. Evalueringsinnstillinger i enhetsprogramvaren

Hvis du har eksportert PCR-kjøringen, starter du LightCycler® 480-programvaren på en annen datamaskin og åpner/importerer PCR-kjøringen. Ellers utfører du analysen på datamaskinen til cobas z 480 Analyzer.

1. Velg algoritmen *Abs Quant/Fit Points* i *Analysis Editor* og den mulige definerte *Subset*.
2. Angi følgende parametere i fanen *Cycle Range*: *First Cycle* 1, *Last Cycle* 42 og *Background* til 5 til 20 ved å velge en *Min Offset* på 4 og en *Max Offset* på 19.
3. Sørg for at *STD Multiplier* er satt til 12 i fanen *Noise Band*, og at *Noise Band* beregnes automatisk.
4. Sett i fanen *Analysis Threshold* til 0,5 og sjekk at antall *Fit Points* er justert til 2.
5. Bekreft deretter alle innstillingene ved å klikke på knappen *Calculate* og utfør analysen. Eksporter datatabellen via *Export Table* ved å høyreklikke som .txt-fil og lagre den på ønsket sted med et tydelig navn.
6. Gå tilbake til *Analysis Editor* og velg algoritmen *Tm Calling* og den mulige definerte *Subset*.
7. Velg også avmerkingsboksen *Height* ved siden av *Tm* og bekreft alle innstillingene ved å klikke på knappen *Calculate* og utfør analyse. Eksporter datatabellen via *Export Table* ved å høyreklikke som .txt-fil og lagre den på ønsket sted med et tydelig navn.

Kapittel 11.6 beskriver analysen og tolkningen av PCR-dataene.

11.5.3. Utføring av PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems

Følg alltid produsentens instruksjoner for bruk av PCR-apparater.

PCR bør utføres i rom 2.

11.5.3.1. Opprette en PCR-mal

1. Slå på PCR-enheten.
2. Programmer PCR-temperaturprotokollen som beskrevet i Tabell 9 ved å velge og redigere temperaturtrinnene og tidene.

Tabell 9 PCR-temperaturprotokoll** på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems

Programme Name	Step	Number of cycles	Temperature	Time (m:ss)
Initialization	1	1 x	94 °C	1:00
Amplification	2	42 x	94 °C	0:15
	3*		66 °C	0:35
	4		GO TO Step 2	41 x
Melt Curve	5	1 x	95 °C	0:15
	6*	1 x	65 °C	0:05
			95 °C	0,5 °C/syklus
Cooling	5	1 x	37 °C	1:00

* Fluorescenssignalet registreres via «Plate Read» i Step 3 og Step 6, som er symbolisert med kamerasymbolet.

** På CFX96 Real-Time PCR Detection Systems er standard rampehastighet 5 °C/sek. Denne innstillingen ble brukt til å validere denne IVD-testen.

3. Sett reaksjonsvolumet til 20 µl og temperaturen på lokkvarmeren *Lid* til 105 °C.
4. Lagre PCR-malen med navnet *GynTect*.

11.5.3.2. Starte PCR-kjøringen

Hvis du lagret PCR-malen tidligere, kan du nå få tilgang til den. Kontroller at riktig temperaturprotokoll er angitt.

1. Plasser GynTect® Strips i PCR-apparatet ved å sette dem loddrett inn i de små brønnene i varmeblokken. Velg et passende plateoppsett (se Figur 10 og Figur 11).

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

Figur 10 Eksempel på plateoppsett for 6 pasientprøver (1–6)

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

Figur 11 Eksempel på plateoppsett for 10 pasientprøver ved bruk av GynTect® GToo3-10

Viktig: Platelayouten kan ikke endres. Positiv kontroll (PC) må plasseres i rad 11 og negativ kontroll (NTC) i rad 12.

2. Gi kjøringen et passende filnavn. Merk at SYBR/FAM- e detekteres før du starter kjøringen.

11.5.3.3. Eksportere data

Etter at PCR-en er fullført, eksporterer du PCR-kjøringen (.pcrd-fil).

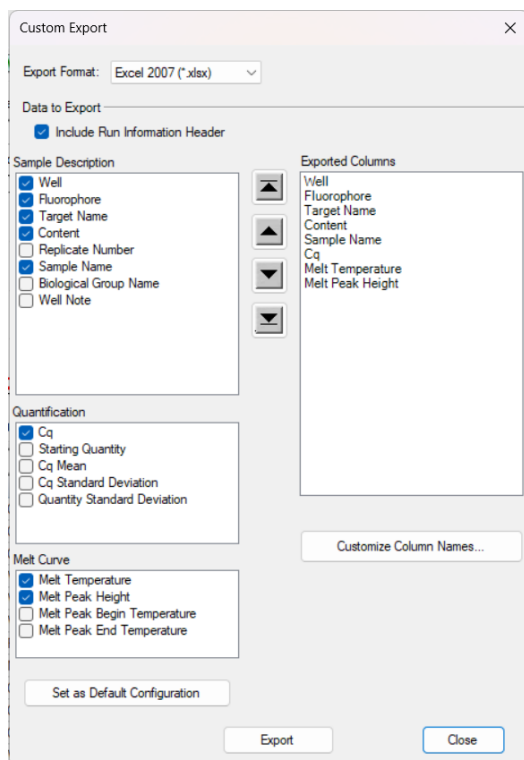
11.5.3.4. Evalueringsinnstillinger i enhetsprogramvaren

1. Åpne Bio-Rad CFX-programvaren på en datamaskin og sett først *Plate Type: BR White* under *User → User Preferences → Plate* for å angi at det brukes hvit plast.
2. Importer .pcrd-filen.
3. Definer plateoppsettet under *Plate Setup → View/Edit Plate*. Skriv inn navnet under *Sample Names*. Ubenyttede posisjoner er merket og kan ekskluderes fra analysen ved å merke av for *Exclude Wells in Analysis*. Bekreft plateoppsettet under *OK*.
4. Angi analyseinnstillingene under *Settings* (se Tabell 10).

Tabell 10 Analyseinnstillinger på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems

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

5. Velg *Load a Preset View* → *Amplification + Melt* under fanen *Custom Data View*. Sett terskelen manuelt i *Melt Peak Chart* til «null» («dra og slipp»).
6. For å eksportere PCR-dataene, velg følgende innstillinger under *Export* → *Custom Export*
 - Format: Excel 2007 (*.xlsx)
 - Data som skal eksporteres → , merk av i følgende bokser
(*Include Run Information Header, Well, Fluorophore, Target Name, Content, Sample Name, Cq, Melt Temperature, Melt Peak Height*)



Figur 12 Tilpasset eksport

7. Trykk på *Export*-knappen og lagre .xlsx-filen under et tydelig navn.

11.6. Evaluering og tolkning av PCR-data

Nedenfor beskrives analysen av de eksporterte dataene.

1. Åpne et egnet regnearkprogram og kopier de eksporterte PCR-dataene inn i det.
2. Formater dataene slik at resultatene for hver prøve skrives i en kolonne og at alle prøvene skrives ved siden av hverandre.

	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Sample 6		PC		NTC	
Marker	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
ASTN1	37.42	82.99	35.62	84.44	38.76	82.74			31.81	83.58	36.51	83.41	28.42	84.55		
DLX1	33.29	81.43	33.33	81.77	30.54	80.46	34.85	81.92	30.55	81.55	38.30	81.61	28.80	82.75		
ITGA4			39.66	80.75					35.82	81.30			28.19	82.84		
RXFP3					36.77	81.47			33.52	82.68			27.80	82.43		
SOX17			36.87	85.01	39.51	82.86			39.16	82.36			31.19	85.07		
ZNF671	37.50	84.78							29.47	82.98		84.24	27.52	86.08		
ACHE	25.54	79.52	25.58	79.88	23.50	79.70	26.63	79.90	24.77	79.76	29.12	79.80	25.58	80.47		74.47
IDS-M	26.36	80.56	26.49	81.18	24.13	80.78	26.77	80.49	25.55	80.34	29.31	81.42	30.45	86.18		

Gyldighetsverifisering av PCR-kjøring

3. PCR-kjøringen er **gyldig** hvis den positive og negative kontrollen oppfyller følgende kriterier (se Tabell 11).

Tabell 11 Gyldighetskriterier for GynTect®-kontrollene

Markør	Positiv kontroll			Negativ kontroll
	Ct-verdi	Smelte temperaturområde (cobas)	Smelte temperaturområde (CFX)	
ASTN1	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 86 °C	78 °C – 86 °C	Ingen verdi*
DLX1	$\geq 20, \leq 38$	79 °C – 85 °C	77 °C – 85 °C	Ingen verdi*
ITGA4	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Ingen verdi*
RXFP3	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Ingen verdi*
SOX17	$\geq 20, \leq 38$	81 °C – 87 °C	79 °C – 87 °C	Ingen verdi*
ZNF671	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 87 °C	78 °C – 87 °C	Ingen verdi*
ACHE	$\geq 20, \leq 38$	78 °C – 83 °C	76 °C – 83 °C	Ingen verdi*
IDS-M	$\geq 20, \leq 38$	78 °C – 88 °C	76 °C – 88 °C	Ingen verdi*

* **Forsiktig:** Du bør ikke motta noen Ct-verdier for den negative kontrollen. Hvis det oppnås en Ct-verdi for noen av markørene, bør den ikke vise en markørspesifikk smeltekurve.

Gyldighet og positivitetsverifisering av prøver

4. Resultatet for pasientprøven er **gyldig** hvis kontrollmarkørene ACHE og IDS M oppfyller følgende kriterier (se Tabell 12).

Tabell 12 Gyldighetskriterier for kontrollmarkører for pasientprøver

Markør	Ct-verdi	Smelte temperaturområde (cobas)	Smelte temperaturområde (CFX)
ACHE	$\geq 20, \leq 42$	78 °C - 83 °C	76 °C - 83 °C
IDS-M	$\geq 20, \leq 32$	78 °C - 88 °C	76 °C - 88 °C

- GynTect®-resultatet for denne prøven anses som **ugyldig** hvis en **Ct-verdi** > 0 , < 20 genereres med en smeltetemperatur innenfor det definerte området.
- For **gyldige** prøver, bruk følgende ligning for å beregne ΔCt -verdien for alle metyleringsspesifikke markører som er påvist med Ct-verdier og smeltetemperaturer i det definerte området (se Tabell 13):

Beregning av ΔCt
$\Delta Ct = Ct_{(\text{Markør x})} - Ct_{(\text{IDS-M})}$

For hver prøve vurderes metyleringsspesifikke markører som **positive** hvis ΔCt -verdiene genererer verdiene i henhold til Tabell 13.

Tabell 13 Kriterier for positivitet for metyleringsspesifikke markører for pasientprøver

Markør	Ct-verdi	Smelte temperaturområde (cobas)	Smelte temperaturområde (CFX)	ΔCt -verdi
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 86 °C	78 °C - 86 °C	$\leq 8,00$
DLX1	$\geq 20, \leq 42$	79 °C - 85 °C	77 °C - 85 °C	$\leq 9,00$
ITGA4	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	$\leq 9,00$
RXFP3	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	$\leq 9,00$
SOX17	$\geq 20, \leq 42$	81 °C - 87 °C	79 °C - 87 °C	$\leq 9,00$
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 87 °C	78 °C - 87 °C	$\leq 10,00$

Viktig: Analyser amplifikasjons- og smeltekurvene med hensyn til kontroversielle datapunkter og kurvekarakteristika. Prøver med kontroversielle kurvekarakteristika må vurderes som ugyldige.

Evaluering av GynTect®-analysen

- For å evaluere en GynTect®-analyse, bruk følgende verdier for de enkelte positive markørene og summer verdiene for de seks markørene:

Tabell 14 Verdier for GynTect®-markørene

Markør	Verdi, hvis markøren er positiv	Verdi hvis markøren er negativ
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Hvis **summen** av alle markørverdiene **er lik eller høyere enn 6**, er GynTect®-analysen av prøven **positiv**.

Hvis **summen** av alle markørverdiene **er lik eller lavere enn 5**, er GynTect®-analysen av prøven **negativ**.

Et positivt GynTect®-testresultat korrelerer med tilstedeværelse av cervikal intraepitelial neoplasi eller cervikalt karsinom. GynTect®-resultatet bør ikke brukes til endelig behandlingsbeslutning, men må vurderes i kombinasjon med andre kliniske funn.

12. YTELSE AV GYNTECT®

Ytelsesdataene som vises her, ble samlet inn på cobas z 480 Analyzer.

12.1. Analytisk ytelse

12.1.1. Analytisk følsomhets – påvisning av metylert DNA

Den analytiske følsomheten til PCR-analysen ble bestemt ved hjelp av metylert, bisulfittkonvertert humant genomisk DNA. De tilsvarende deteksjonsgrensene er oppsummert i Tabell 15. Fortynningsseriene ble testet i tre uavhengige eksperimenter, hver i tre replikater. Ved bruk av normale skraperbiter brukes 20–50 ng til analysen.

Tabell 15 Analytisk følsomhet for PCR-analysen – del 1

Brukt DNA	Omtrentlig antall celler i analysen*	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0,2 ng	30 celler	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
0,1 ng	15 celler	9/9	9/9	9/9	8/8	8/8	9/9
0,05 ng	7,5 celler	9/9	9/9	9/9	9/9	5/9	9/9
0,02 ng	3 celler	7/9	8/9	6/9	9/9	6/9	8/9
0,01 ng	1,5 celler	5/9	5/9	6/9	8/9	5/9	6/9
0,005 ng	< 1 celle	8/9	7/9	4/9	6/9	1/9	6/9
0,002 ng	< 1 celle	3/9	3/9	1/9	2/9	0/9	1/9

* Én celle inneholder ca. 6–7 pg genomisk DNA

Den totale deteksjonsgrensen, ved hvilken metyleringsmarkørene er påvisbare i alle reaksjoner, ligger på 15 celler (0,1 ng).

Videre ble en DNA-blanding bestående av metylert bisulfittkonvertert humant genomisk DNA og umetylert bisulfittkonvertert humant genomisk DNA testet i lignende eksperimenter. I hver analyse ble det brukt henholdsvis 20 ng og 100 ng DNA. Fortynningsseriene ble testet i tre uavhengige eksperimenter, hver i triplikater (se Tabell 16).

Tabell 16 Analytisk følsomhet av PCR-analysen – del 2

Prosentandel metylert DNA	Total DNA	ASTN1 ΔCp ≤ 8	DLX1 ΔCp ≤ 9	ITGA4 ΔCp ≤ 9	RXFP3 ΔCp ≤ 9	SOX17 ΔCp ≤ 9	ZNF671 ΔCp ≤ 10
10 %	20 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
1 %	20 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
0,1 %	20 ng	5 / 8*	8 / 8*	8 / 8*	6 / 8*	1 / 8*	7 / 8*
0,01 %	20 ng	0 / 9	9 / 9	3 / 9	2 / 9	0 / 9	4 / 9
0 %	20 ng	0 / 9	8 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9
10 %	100 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
1 %	100 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	8 / 9	9 / 9	8 / 9
0,1 %	100 ng	8 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	1 / 9	9 / 9
0,01 %	100 ng	0 / 9	8 / 9	1 / 9	1 / 9	0 / 9	4 / 9
0 %	100 ng	0 / 9	9 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9

* Én av ni prøver var negativ for ACHE og må ekskluderes.

Deteksjonsgrensen for et positivt resultat av metyleringsmarkørene er 1 % for en prøve med totalt 20 ng DNA eller 10 % for en prøve med 100 ng DNA per analyse.

Resultatene av et spike-in-eksperiment med SiHa-celler i pasientprøver viser at i pasientprøver med en konsentrasjon på minst 3×10^5 celler per ml kan en andel på 0,1 % metylerte celler påvises pålitelig.

12.1.2. Analytisk spesifisitet – påvisning av umetylert DNA

Den analytiske spesifisiteten til PCR-analysen ble bestemt ved hjelp av 10 - 12 kb lange, umetylert bisulfittkonverterte PCR-fragmenter som representerer det komplette humane genomet. Eksperimentene ble utført i en 5-fold bestemmelse, og resultatene er oppsummert i Tabell 17. Gyldigheten av prøvene ble sikret av ACHE. Det ble ikke oppnådd positive GynTect®-testresultater opp til en konsentrasjon på 750 ng umetylert, bisulfittkonvertert DNA (biDNA).

Tabell 17 Analytisk spesifisitet av PCR-analysen

Brukt DNA	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0 ng umetylerte biDNA	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
100 ng umetylerte biDNA	0 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
250 ng umetylert biDNA	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5
500 ng umetylert biDNA	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
750 ng umetylert biDNA	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
75 ng metylert gDNA	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

12.2. Presisjon

12.2.1. Repeterbarhet

20 forskjellige prøver ble testet tre ganger med GynTect®. I hvert tilfelle ble det utført en ny preparering og bisulfittbehandling av prøvene. Alle tre eksperimentene ble utført av én person, men på forskjellige dager. 16 prøver ga identiske resultater i 3 av 3 gjennomføringer. Dermed kan 80 % av prøvene ha en repeterbarhet på 100 % i tre eksperimenter.

12.2.2. Reproduserbarhet

20 forskjellige prøver ble testet tre ganger med GynTect® i uavhengige laboratorier. I hvert tilfelle ble det utført en ny preparering og bisulfittbehandling av prøvene, og det ble brukt forskjellige PCR-apparater (cobas z 480 Analyzer resp. LightCycler II 480). Sammenligningen av to resultater for hver prøve gir tre vurderinger per prøve (lab a versus lab b, lab b versus lab c, lab a versus lab c). Dataene som ble innhentet på denne måten, viste at 90 % av vurderingene var identiske. Evalueringen av gyldig sammenligning resulterer i 96,43 % reproduserbarhet.

12.3. Robusthet

Følgende variasjoner i temperaturprofilen for PCR-kjøringen ble testet, uten at det ble observert avvik i det endelige GynTect®-resultatet (utført med fire forskjellige prøver og en kontroll uten mal):

Tabell 18 Variasjoner i temperaturprofilen

Avvik fra opprinnelig protokoll	Effekter på positivitet GynTect® PC	Gjennomsnittlig endring i Cp-verdi alle markører
65 °C Annealing-temperatur	ingen	< 1
67 °C Annealingstemperatur	ingen	< 1
92 °C Denatureringstemperatur	ingen	< 1
96 °C Denatureringstemperatur	ingen	< 1
96 °C Denatureringstemperatur & 10 sek Denaturering & 30 sek. annealing/forlengelse	ingen	opptil 1,12 høyere
96 °C Denatureringstemperatur og 20 sek Denaturering og 40 sek. annealing/forlengelse	ingen	< 1

Plasseringen av prøven i PCR-apparatet har ingen innvirkning på GynTect®-resultatet.

12.4. Klinisk ytelsesevaluering

Pasientprøvene som ble brukt, ble hentet fra europeiske sykehus (Tyskland, Portugal, Slovakia).

Bisulfittbehandling av pasientprøvene ble utført som beskrevet i kapittelet 11.4.

For å bestemme den kliniske ytelsen til GynTect® ble 321 pasientprøver med følgende egenskaper undersøkt: Pap I (n = 199; 62 %), CIN 1 (n = 20; 6,2 %), CIN 2 (n = 28; 8,7 %), CIN 3 (n = 64; 19,9 %), livmorhalskreft (n = 10; 3,1 %).

Basert på den fastsatte grenseverdien ble klinisk sensitivitet og spesifisitet beregnet.

Tabell 19 Klinisk ytelse av GynTect®

Funnet	GynTect®-deteksjon	KI 95 %
Pap I (n = 199)	4,02 %	1,75 % - 7,77 %
CIN 1 (n = 20)	30,00 %	11,89 % - 54,28 %
CIN 2 (n = 28)	39,29 %	21,50 % - 59,42 %
CIN 3 (n = 64)	62,50 %	49,51 % - 74,30 %
CxCa (n = 10)	100 %	69,15 % - 100 %

KI = konfidensintervall

Tabell 20 Sensitivitet og spesifisitet

Sensitivitet for CIN 3+	Spesifisitet for CIN 3+	Falsk positiv rate for Pap I
67,6 %	89,9 %	4,0 %

13. BEGRENSNINGER VED PROSEDYREN

- Tolkning av GynTect®-resultatene bør alltid utføres i sammenheng med resultater fra ytterligere laboratoriediagnostiske prosedyrer, samt under hensyntagen til det kliniske bildet.
- Spesifikasjonene i bruksanvisningen, f.eks. pipetteringsvolumer, inkubasjonstider, temperaturer og prepareringstrinn, må overholdes for å unngå feilaktige resultater.
- Riktig prøvetaking og oppbevaring er avgjørende for testresultatene.
- I prinsippet kan det ikke utelukkes i molekylærbiologiske testprosedyrer at ytterligere svært sjeldne sekvensvarianter kan påvirke testresultatet, som ennå ikke er dekket i kildene som er konsultert for spesifisitet og sensitivitetsanalyse av primere og prober.
- Ikke-spesifisert instrumentytelse, samt avvik fra den beskrevne testprosedyren, spesifiserte lagringsforhold, materialer, utstyr eller anbefalt prøvemateriale, kan føre til avvik fra resultatene som oppnås når alle spesifikasjoner er oppfylt.
- De medfølgende interne og eksterne kontrollene er hjelpemidler for å oppdage feil. De kan imidlertid ikke oppdage alle mulige feil. Det er brukerens ansvar å validere eventuelle endringer som er gjort eller, om nødvendig, utstyret som brukes, og å sikre at utstyrets spesifikasjoner overholdes.

14. REFERANSER

- [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). Humant papillomavirus er en nødvendig årsak til invasiv livmorhalskreft over hele verden. J Pathol. 189(1):12-19
- [3] Cuzick et al. (2006). Oversikt over europeiske og nordamerikanske studier om HPV-testing i primær screening for livmorhalskreft. Int J Cancer. 119(5):1095-1101
- [4] Hansel et al. (2014). En lovende DNA-metyleringssignatur for triagering av kvinner med høy risiko som er DNA-positive for humant papillomavirus. PLOS ONE. Bind 9, utgave 3, e91905
- [5] Schmitz et al. (2017). Ytelse av en metyleringsspesifikk realtids-PCR-analyse som triagetest for HPV-positive kvinner. Clinical Epigenetics. 9:118
- [6] Schmitz et al. (2018). Ytelse av et DNA-metyleringsmarkørpanel ved bruk av væskebaserte livmorhalsprøver for å påvise livmorhalskreft og forstadier til kreft. BMC Cancer. 18:1197
- [7] Internasjonalt byrå for kreftforskning (2008). Europeiske retningslinjer for kvalitetssikring i screening for livmorhalskreft – Andre utgave

15. **ANSVAR**

GynTect® Kit må kun brukes i samsvar med dets tiltenkte formål. Epitype GmbH påtar seg intet ansvar for annen bruk (f.eks. manglende overholdelse av denne bruksanvisningen og feil bruk) og eventuelle skader som følge av dette.

16. **SPØRSMÅL OG PROBLEMER**

Ved spørsmål og problemer med produktet, vennligst ta kontakt med din kontaktperson hos Epitype GmbH.

Du kan nå den tekniske supporten til Epitype GmbH mandag til fredag mellom kl. 08.00 og 16.00 på følgende nummer: **+49 (0) 3641 5548500**.

Utenfor disse kontakttidene kan du kontakte oss via e-post: **support@epitype.de**.

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden, Deutschland (Tyskland)

Administrerende direktører: Dr. Alfred Hansel, Dr. Martina Schmitz, Dr. Timm Zörgiebel

Hvis noen av følgende feil oppstår under behandlingen av livmorhalsprøvene, utførelsen av PCR, analysen av dataene og/eller feil i hele GynTect®-analysen på grunn av en av kontrollene, må du gå frem som beskrevet nedenfor.

Tabell1 Feilsøking

Problem og årsak	Merknader og forslag
CENTRIFUGE Ingen sentrifuge tilgjengelig for PCR-strips/plater	 Rist 8-brønnsstripen kraftig fra håndleddet til all væske er på bunnen av brønnene. Innsiden av lokket må være fri for dråper. Gjenta prosessen om nødvendig.
UGYLDIGE SMELTEMETNINGER GynTect® Strip ble plassert i PCR-systemet og rotert 180°. Amplifikasjons- og smeltkurver er synlige, men smeltetemperaturene avviker betydelig fra kravene angitt i bruksanvisningen	 Smeltepunktstemperaturen i posisjon B skal tilsvare smeltepunktstemperaturen i posisjon G. Brønn A og B viser amplifikasjon for alle GynTect® Strips unntatt den negative kontrollen. Prøvene kan analyseres. Ta kontakt med Epitype GmbH.

NEI / UGYLDIG PCR-RESULTAT

Ct-verdien for markøren IDS-M er over målverdien

Gjenta testen for prøven ved å bruke en ny GynTect®-analyse.

Gjenta testen for prøven ved å bruke en ny GynTect®-analyse, eventuelt med et høyere prøvevolum (2 ml til 3 ml). Ved ytterligere negativt resultat for markørene kan pasientprøven ikke analyseres.

Overskridelse av målverdien for GynTect® Positive Control og/eller GynTect® negativ kontroll

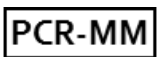
Gjenta GynTect® for alle prøver med fylte prøveeluat (ad 80 µl GynTect® Water).

17. TILLEGGSMERKNADER

Regulatorisk merknad til kunder i EU: Vær oppmerksom på at du er forpliktet til å rapportere alle alvorlige hendelser som har oppstått i forbindelse med produktet til din kompetente myndighet og til Epitype GmbH.

Den gjeldende versjonen av sikkerhetsdatabladet for dette produktet finnes i nedlastingssenteret på nettstedet (<https://www.epitype.de/en/downloadcenter/>) eller kan bestilles via e-post til support@epitype.de.

18. BETYDNINGEN AV SYMBOLENE

Symbol	Betydning	Symbol	Betydning
	Mastermix		Oppbevaringstemperatur
	PCR-strips		Hvis uåpnet, brukbar til (ÅÅÅÅ-MM-DD)
	Lokk		Innhold tilstrekkelig for <n> tester
	Positiv kontroll		Produsent
	Vann		Følg bruksanvisningen
	In vitro-diagnostikk		Beskytt mot sollys
	Batchkode		Ikke gjenbruk
	Katalognummer		CE-merking

19. LISTE OVER ENDRINGER

Forrige versjon (Utgivelsesdato)	Endringer
	Revisjon 7 av IFU er den første versjonen som er oversatt til norsk.

20. KORT PROTOKOLL

Nedenfor finner du en mal for en kort protokoll i form av en sjekkliste.

Før du bruker denne korte protokollen, må du lese alle instruksjonene med alle merknader og tips i kapittelet 11.

Bisulfitt-settet er ikke en del av GynTect® Kit. Bisulfittbehandling av prøvene må utføres ved hjelp av EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10).

PRØVEFORBEREDELSE

- ☐ Vortex pasientprøven i 5 sekunder ved maksimal hastighet og overfør 1 ml medium til et 1,5 ml rør.
- ☐ Sentrifuger prøven i 5 minutter ved 10 000 xg
- ☐ Fjern 900 µl supernatant over pellet og kast

BISULFITTBEHANDLING AV PRØVENE

- ☐ Forbered EpiTect® Fast Bisulfite Kit-buffere i henhold til tabell a.

Tabell a Buffersammensetning EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Buffer	Tilsett etanol
Buffer BL *	-
Buffer BW	30 ml etanol (96–100 %)
Buffer BD	27 ml etanol (96–100 %)

* ikke tilsett Carrier RNA, kvalitetskontroll

- ☐ Sett opp reaksjonen i henhold til tabell b, i et 0,5 ml rør, vortex og sentrifuger

Tabell b Bisulfittreaksjon

Forbindelse	Per reaksjon
Bisulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Resuspendert prøve	40 µl
Totalt volum/reaksjon	140 µl

* Kvalitetskontroll

- ☐ Konvertering ved hjelp av en termisk syklator, sjekk temperaturprofilen i henhold til Tabell 7
- ☐ Vortex prøvene og sentrifuger kort
- ☐ Tilsett **310 µl Buffer BL** til MinElute® Spin Column
- ☐ Tilsett prøve og pipetter 5 x opp og ned
- ☐ Tilsett **250 µl etanol** (96–100 %), bland 5 ganger ved å snu kolonnen opp ned
- ☐ Sentrifuger kolonnen i 30 sekunder ved 18 000 xg og kast gjennomstrømningen
- ☐ Tilsett **200 µl Buffer BW** og sentrifuger kolonnen i 30 sekunder ved 18 000 xg
- ☐ Tilsett **200 µl Buffer BD** og inkuber ved romtemperatur i 15 minutter
- ☐ Sentrifuger kolonnen i 30 sekunder ved 18 000 xg
- ☐ Tilsett **200 µl Buffer BW** og sentrifuger kolonnen i 30 sekunder ved 18 000 xg og kast gjennomstrømningen
- ☐ Tilsett **400 µl Buffer BW** og sentrifuger kolonnen i 30 sekunder ved 18 000 xg
- ☐ Tilsett **200 µl etanol** (96–100 %) og sentrifuger kolonnen i 30 sekunder ved 18 000 xg

- ☐ Plasser kolonnen i et nytt 2 ml Collection-Tube og sentrifuger kolonnen i 60 sekunder ved 18 000 xg
- ☐ Plasser kolonnen i et 1,5 ml rør, tilsett **20 µl vann** og inkuber i 60 sekunder ved romtemperatur.
- ☐ Sentrifuger kolonnen i 60 sekunder ved 8 000 xg
- ☐ *Valgfritt bruddpunkt:* arbeidsflyten kan avbrytes her, prøvene kan lagres

FORBEREDELSE OG PIPETTERING AV PCR

- ☐ Tilsett **70 µl GynTect® Water** til hver prøve, vortex og sentrifuger kort
- ☐ Vortex og sentrifuger kort **GynTect® Mastermix**
- ☐ Fjern de fargede hettene fra **GynTect® Strips** som skal brukes
- ☐ Tilsett **10 µl GynTect® Mastermix** til hver reaksjonsbrønn
- ☐ Tilsett **10 µl prøve** eller **GynTect® Positive Control** eller **GynTect® Water** til hver av de åtte brønnene på en tilsvarende **GynTect® Strips**
- ☐ Lukk **GynTect®S Strips** med **GynTect® Caps**
- ☐ Vortex og sentrifuger **GynTect® Strips** kort

UTFØR PCR

- ☐ Start PCR-enheten, åpne programvaren og velg mal (*GynTect*)
- ☐ Gi PCR-kjøringen et navn, forbered plateoppsettet og sjekk temperaturprofilen
- ☐ Lagre PCR-kjøringen
- ☐ Plasser **GynTect® Strips** i enheten og start PCR-kjøringen
- ☐ Etter at PCR er fullført, gjør du evalueringsinnstillingene og eksporterer .txt- eller .xlsx-filen

ANALYSE OG TOLKNING AV PCR-DATA

- ☐ Åpne eksporterte filer (.txt eller .xlsx) i et egnet regnearkprogram
- ☐ Kontroller resultatene for **positiv kontroll** og **negativ kontroll** for alle markører
- ☐ Kontroller alle prøver for gyldighet og positivitet i henhold til tabell c

Tabell c Kriterier for gyldighet og positivitet

Markør	Ct-verdi	Smelte temperaturområde (cobas)	Smelte temperaturområde (CFX)	ΔC_t (Markør x - IDS-M)	Kriterier for
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 86 °C	78 °C – 86 °C	$\leq 8,00$	positivitet
DLX1	$\geq 20, \leq 42$	79 °C - 85 °C	77 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
ITGA4	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
RXFP3	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
SOX17	$\geq 20, \leq 42$	81 °C - 87 °C	79 °C – 87 °C	$\leq 9,00$	
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 87 °C	78 °C – 87 °C	$\leq 10,00$	
ACHE	$\geq 20, \leq 42$	78 °C - 83 °C	76 °C – 83 °C	-	gyldighet
IDS-M	$\geq 20, \leq 32$	78 °C - 88 °C	76 °C – 88 °C		

- ☐ Evaluer **GynTect®-resultatene**

Tabell d Verdier for GynTect®-markørene

Markør	Verdi, hvis markøren er positiv	Verdi, hvis markøren er negativ
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Sum av alle verdier ≥ 6
→ GynTect®-positiv

Et positivt GynTect®-testresultat korrelerer med tilstedeværelse av cervikal intraepitelial neoplasia av type eller cervikalt karsinom av type . GynTect®-resultatet bør ikke brukes til å ta en endelig beslutning om behandling, men må vurderes i kombinasjon med andre kliniske funn.