



ScreenYu Gyn®

Základní UDI-DI: 426076785SCREENYUGYNP6

Návod k použití

REF

SG001-46



Až 46 vzorků

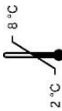
UDI-DI

4260767852212

Před použitím tohoto testu si prosím pečlivě přečtěte tento návod k použití a přesně jej dodržujte, aby byly dosažené výsledky spolehlivé.



ScreenYu Gyn® je In-Vitro diagnostický kit určený pro kvalitativní detekci epigenetického markeru v bisulfiticky-konvertované DNA z cervikálních vzorků žen s pozitivním výsledkem HPV testu nebo s nápadným Pap nálezem, který je třeba ještě objasnit. Pozitivní výsledek testu ScreenYu Gyn® souvisí s přítomností cervikální intraepiteliální neoplasie nebo rakovinou děložního krčku.



Pro použití při diagnostice *in vitro* (IVD) pouze vyškoleným personálem.



Revize 9 (2026-02)
Překlad zveřejněn v 2026-02



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



USKLADNĚTE OKAMŽITĚ PO DORUČENÍ

ScreenYu Gyn® Kit se přepravuje při pokojové teplotě a teplotní indikační značka slouží k monitorování, zda byl překročen validovaný teplotní interval. Ihned po přijetí zkontrolujte teplotní indikační značku připevněnou k soupravě a ověřte, zda došlo ke změně barvy. Také zkontrolujte vnější balení, uzávěr a primární balení a ověřte, že nejsou poškozeny. Soupravu je nutno ihned po přijetí ochladit na teplotu mezi 2 °C až 8 °C a chránit před světlem. Při dodržení přepravních a skladovacích podmínek lze ScreenYu Gyn® Kit a její součásti používat do uvedeného data.



Monitorování teploty při přepravě

Teplotní indikační značka připevněná k ScreenYu Gyn® Kit monitoruje teplotu během přepravy. Světle stříbrná značka znamená, že souprava byla doručena při předepsané přepravní teplotě. Černá značka dokazuje nedodržení předepsané přepravní teploty, což znamená, že funkční parametry ScreenYu Gyn® Kit nemohou být nadále zaručeny. V takovém případě prosím kontaktujte společnost Epitype GmbH.

OBSAH

1	Určeným Účelem	4
2	Klinický význam	4
3	Princip stanovení.....	4
4	Uspořádání stanovení ScreenYu Gyn®	5
4.1	ScreenYu Gyn® Strips	5
4.2	Kontroly	5
4.2.1	Kontrola kvality ošetření hydrogensířičitanem (kontrolní marker ACTB)	5
4.2.2	Pozitivní kontrola	5
4.2.3	Negativní kontrola	6
5	Referenční materiály	6
6	Obsah soupravy	6
7	Spotřební materiál a vybavení (není součástí soupravy)	7
8	Uchovávání a doba použitelnosti	8
9	Bezpečnostní pokyny	8
9.1	Obecné informace.....	8
9.2	Prostorové uspořádání místností	9
9.3	Prevence kontaminace.....	9
9.4	Pokyny k manipulaci	9
10	Likvidace.....	10
11	Postup stanovení ScreenYu Gyn®	11
11.1	Pracovní postup	11

11.2	Odběr vzorků	11
11.3	Příprava vzorku	12
11.4	Ošetření vzorků hydrogensiřičitanem	12
11.5	PCR	13
11.5.1	Příprava a pipetování PCR reakce.....	13
11.5.2	Provádění PCR na analyzátoru cobas z 480	14
11.5.3	Provádění PCR na systému CFX96 Real-Time PCR Detection System.....	19
12	Parametry stanovení ScreenYu Gyn®	23
12.1	Analytické funkce.....	23
12.1.1	Analytická citlivost	23
12.1.2	Analytická specifická – detekce nemetylované DNA.....	24
12.2	Přesnost.....	25
12.2.1	Opakovatelnost	25
12.2.2	Reprodukovatelnost.....	25
12.3	Pravdivost	25
12.4	Správnost.....	25
12.5	Robustnost.....	25
12.6	Mezní hodnota	25
12.7	Parametry při klinickém použití	26
13	Meze tohoto postupu.....	27
14	Literatura	27
15	Právní odpovědnost	27
16	Dotazy a problémy.....	28
17	Další poznámky.....	28
18	Význam symbolů	28
19	Seznam změn	29
20	Zkrácený protokol.....	29

1 URČENÝM ÚČELEM

ScreenYu Gyn® je in vitro diagnostický kit určený pro kvalitativní detekci epigenetického markeru v bisulfity-konvertované DNA z cervikálních vzorků žen s pozitivním výsledkem HPV testu nebo s nápadným Pap nálezem, který je třeba ještě objasnit. Pozitivní výsledek testu ScreenYu Gyn® souvisí s přítomností cervikální intraepiteliální neoplasie nebo rakovinou děložního krčku.

Souprava ScreenYu Gyn® je určena pro použití pouze kvalifikovaným personálem obeznámeným s technikami molekulární biologie. Interpretaci výsledků je třeba vždy provádět v souvislosti s výsledky dalších laboratorních diagnostických postupů, a také přitom zohlednit klinický obraz.

2 KLINICKÝ VÝZNAM

Karcinom děložního čípku je čtvrtým nejčastějším typem nádoru u žen na celém světě s > 600 000 nových případů každý rok [1]. V podstatě u všech případů je přetrvávající infekce karcinogenním lidským papilomavirem (HPV) základní příčinou [2] a předpokladem rozvoje karcinomu děložního čípku. U žen negativních na HPV existuje extrémně nízké riziko rozvoje karcinomu děložního čípku, ale ani u většiny žen s infekcí HPV nedojde k rozvoji prekancerózy. Pouze u přibližně 15 % žen s infekcí HPV dojde ke skutečnému rozvoji prekancerózy nebo karcinomu, který vyžaduje léčbu [3].

Pacientkám s pozitivním výsledkem HPV testu a/nebo dosud neobjasněným nálezem Pap testu se tedy doporučuje použít screeningový test jako je ScreenYu Gyn®, který umožní zjistit pravděpodobnost výskytu karcinomu nebo předcházejícího stavu s vysokou přesností.

Stanovení ScreenYu Gyn® se nemá pokládat za konečné rozhodnutí o léčbě; je nutné jej analyzovat společně s ostatními klinickými nálezy.

3 PRINCIP STANOVENÍ

Základem stanovení ScreenYu Gyn® je detekce epigenetického biomarkeru, tj. metylace určitého úseku DNA, jehož přítomnost odpovídá výskytu prekanceróz nebo karcinomu děložního čípku [4, 5, 6]. Navíc je analyzován také referenční marker specifický pro hydrogensičičitan. Použité oblasti markerů jsou uvedeny v tabulce níže.

Přehled oblastí markerů

Označení v protokolu	Oblast markeru (označení genu)	Fluorescenční barvivo
Marker metylace	ZNF671	ROX
Kontrolní marker	ACTB	FAM

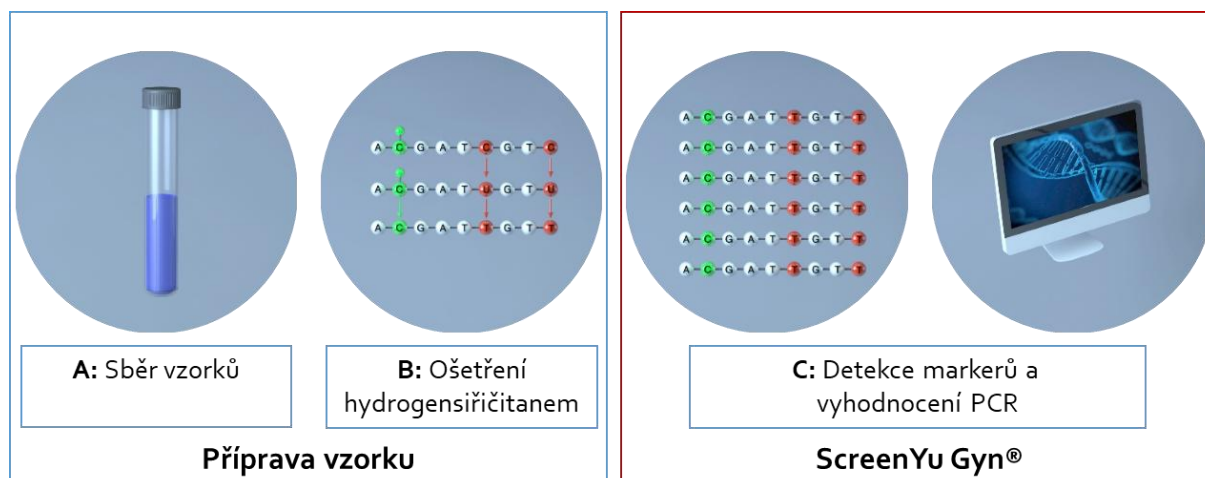
Detekce se provádí metodou vysoce citlivého kvantitativního PCR pomocí sond. Výstupem kvantitativních přístrojů je hodnota Cp (Cross point, cobas z 480 Analyzer) nebo hodnota Cq (Cycle quantification, CFX96 Real-Time PCR Detection System); obě odpovídají prahové hodnotě cyklu Ct a jsou takto také níže označovány. Tato hodnota odpovídá cyklu při kvantitativní PCR, v němž fluorescence poprvé vystoupá nad definovanou prahovou hodnotu.

Analýza vzorku pacientky pomocí testu ScreenYu Gyn® sestává ze dvou kroků.

Nejprve je DNA ve stěru z děložního krčku konvertována hydrogensičičitanem sodným, čímž se zafixuje metylace DNA. Ve druhém kroku je eluovaná, hydrogensičičitanem ošetřená DNA analyzována s použitím kvantitativního PCR pomocí sondy specifické pro metylaci. Původně metylovaný úsek DNA je selektivně amplifikován pomocí primerů ve stripech ScreenYu Gyn®. Detekce markeru metylace a kontrolního markeru se provádí pomocí sond označených

fluorescenčními barvivy. Součástí je také pozitivní a negativní kontrola k potvrzení PCR. Poté je provedena analýza specifická pro stanovení.

Odběrová ani hydrogensířičitanová souprava nejsou součástí soupravy ScreenYu Gyn® Kit. Produkty speciálně navržené pro odběr vzorků a ošetření hydrogensířičitanem se prodávají samostatně.



Princip stanovení

A: Gynekolog provede stěr z děložního čípku pacientky pomocí vhodné odběrové soupravy.

B: Diagnostická laboratoř provede ošetření vzorku pacientky hydrogensířičitanem.

C: U každého vzorku je provedena jedna duplexní PCR reakce. Analýza je provedena detekcí barvivy označených sond ve stripu ScreenYu Gyn®.

4 USPOŘÁDÁNÍ STANOVENÍ SCREENYU GYN®

4.1 ScreenYu Gyn® Strips

Při stanovení ScreenYu Gyn® se používají sondy TaqMan. ScreenYu Gyn® Strip je 8jamkový PCR strip, který v každé jamce obsahuje dva páry primerů a příslušnou sondu pro amplifikaci markeru ZNF671 specifického pro metylaci a kontrolního markeru ACTB. K analýze vzorku pacientky je nutná jedna jamka ScreenYu Gyn® Strip.

4.2 Kontroly

Uspořádání ScreenYu Gyn® Kit zahrnuje tři kontroly k monitorování kvality vzorku a ošetření hydrogensířičitanem (marker ACTB), a také kvality reakce PCR (pozitivní kontrola a negativní kontrola).

4.2.1 Kontrola kvality ošetření hydrogensířičitanem (kontrolní marker ACTB)

Tento kontrolní marker ověřuje úspěšnost konverze všech nemetylovaných cytosinů na uracil, a tedy kvalitu provedeného ošetření hydrogensířičitanem. Detekce se provádí amplifikací fragmentu DNA v blízkosti lidského genu pro beta-aktin (ACTB). Pokud nedojde k amplifikaci ACTB s hodnotou Ct pod 32, stanovení vzorku je pokládáno za neplatné a musí se opakovat.

4.2.2 Pozitivní kontrola

Pozitivní kontrola monitoruje kvalitu PCR. Amplifikace testu ScreenYu Gyn® Positive Control (PC) má poskytnout hodnotu Ct pod 38 u markeru metylace i kontrolního markeru. V opačném případě je PCR neplatné a musí se opakovat.

4.2.3 Negativní kontrola

Negativní kontrola je kontrolní reakce se ScreenYu Gyn® Water použitou jako matrice (NTC – kontrola bez matrice), která musí být negativní pro oba markery. Pokud se v negativní kontrole vyskytnou hodnoty Ct, je velmi pravděpodobná kontaminace a stanovení ScreenYu Gyn® se musí opakovat.

5 REFERENČNÍ MATERIÁLY

Nejsou dostupné žádné mezinárodní referenční materiály.

6 OBSAH SOUPRAVY

Obsah soupravy ScreenYu Gyn® Kit

Označení součástí	Symbol	Obsah	Objem/množství SG001-46
ScreenYu Gyn® Mastermix	PCR-MM	PCR Mastermix ¹ (2x)	1 x 0,55 ml
ScreenYu Gyn® Strip	STRIPS	PCR strip ²	6 stripů
ScreenYu Gyn® Caps	CAPS	Víčko pro strip	6 víček
ScreenYu Gyn® Positive Control	CONTROL+	Pozitivní kontrola	1 x 90 µl
ScreenYu Gyn® Water	H₂O	Voda	1 x 2 ml
Návod k použití	–	Návod k použití	1

¹ Obsahuje všechny složky potřebné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) kromě primerů, sond a matrice.

² Obsahuje primery a sondy potřebné pro PCR.

7 SPOTŘEBNÍ MATERIÁL A VYBAVENÍ (NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY)

Stanovení ScreenYu Gyn® může provádět pouze kvalifikovaný personál, a to s pomocí uvedeného spotřebního materiálu a vybavení. Veškeré vyžadované laboratorní vybavení musí být nainstalováno, kalibrováno, používáno a udržováno podle pokynů výrobce.

Pokožovou teplotou se rozumí teplota mezi 15 °C a 30 °C.

Potřebné vybavení

Vybavení	Katalogové č.	Společnost
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® nebo Cervex-Brush® Combi	–	Rovers Medical Devices

* Pro použití jako *Balance Strips* v PCR viz rozložení destičky na straně 15 nebo 19.

Stanovení ScreenYu Gyn® vyžaduje dále uvedené laboratorní vybavení a spotřební materiál.

- Odstředivka na reakční zkumavky 0,5 ml / 1,5 ml, $\geq 10\ 000\ \text{xg}$
 - Odstředivka na PCR stripy
 - Termocykler na reakční zkumavky 0,5 ml
 - Vířivá třepačka / třepačka
 - Pipety s různým rozsahem objemu a příslušné špičky s filtrem (sterilní, beze stop DNázy)
 - Stojánek na reakční zkumavky 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml
 - 96jamkový držák na PCR stripy
 - Reakční zkumavky 0,5 ml / 1,5 ml (beze stop DNázy)
 - Nedenaturovaný ethanol (96–100 %)
 - Přístroj pro kvantitativní PCR, detekční kanál pro sondová barviva FAM a ROX
- Test ScreenYu Gyn® byl validován na následujících přístrojích pro kvantitativní PCR:
- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) s blokem s 96 jamkami, adaptérem pro PCR stripy a zařízení LightCycler® 480 Software UDF 2.0.0 (Service Pack 3), vyhodnoceno s verzí 1.5.1.62
 - CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) s verzí softwaru CFX Maestro 2.3

8 UCHOVÁVÁNÍ A DOBA POUŽITELNOSTI

Při dodržení přepravních a skladovacích podmínek lze ScreenYu Gyn® Kit a její součásti používat do uvedeného data. Všechna činidla v soupravě jsou po otevření stabilní po uvedenou dobu použitelnosti, pokud jsou uchovávána za uvedených podmínek a chráněna před kontaminací.

Teplota uchovávání soupravy ScreenYu Gyn® Kit a vybavení, které není součástí soupravy

Vybavení	Teplota uchovávání
ScreenYu Gyn® Kit	2 °C až 8 °C
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE IVD)	15 °C až 30 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C až 30 °C
Cervex-Brush® nebo Cervex-Brush® Combi	15 °C až 30 °C

9 BEZPEČNOSTNÍ POKYNY

9.1 Obecné informace

Při použití moderních metod molekulární biologie je nutno přesně dodržovat dále uvedené pokyny, aby byla zajištěna maximální bezpečnost personálu laboratoře a byly dosaženy vysoce kvalitní výsledky:

- Protože tato souprava využívá molekulárně-biologické procesy, jako je ošetření hydrogensulfitanem, amplifikace a detekce DNA, je určena pouze pro diagnostiku *in vitro* a má ji používat pouze personál vyškolený v laboratorních metodách pro diagnostiku *in vitro*.
- Před použitím výrobku si pozorně přečtěte návod k použití. Je nutné brát v úvahu pouze aktuální verzi.
- Při každém kroku noste vhodný laboratorní plášť, jednorázové rukavice a v případě potřeby i ochranné brýle.
- Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky a dbejte také, aby nedošlo k jejich vystříknutí nebo rozprášení.
- Vyhřívané víko a inkubační blok termocykleru mohou dosahovat teploty až 110 °C. Je zde nebezpečí popálení kůže. Dodržujte provozní pokyny pro zařízení.
- Po manipulaci se vzorky a činidly si důkladně umyjte ruce.
- Nepoužívejte ScreenYu Gyn®, pokud je balení činidel porušené. Kontaktujte svého distributora.
- ScreenYu Gyn® Kit nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti a nepoužívejte prošlá činidla.
- Nemíchejte činidla z různých šarží, a také nemíchejte činidla ze soupravy s činidly od jiných výrobců.
- Používejte pouze materiály dodávané se soupravou nebo doporučené jejím výrobcem.
- Veškeré vyžadované laboratorní vybavení musí být nainstalováno, kalibrováno, používáno a udržováno podle pokynů výrobce.
- Pipetování malých objemů kapaliny (několika mikrolitrů) vyžaduje praxi. Ujistěte se, že pipetujete vyžadované objemy mikropipetami co nejpřesněji.
- Je nezbytné dodržovat relevantní regulační požadavky týkající se obsluhy.
- Předpokládá se dodržování správné laboratorní praxe (GLP), jak ji definuje např. Úřad pro kontrolu potravin a léků USA (FDA) nebo Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj

(OECD). Konkrétně je třeba zohlednit doporučení ohledně provádění testů s použitím molekulární amplifikace.

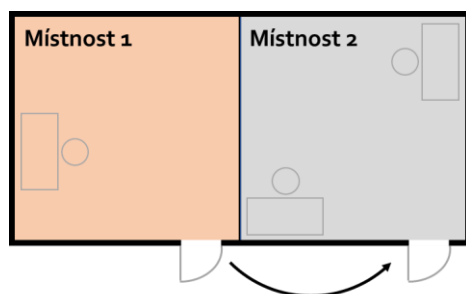
- Řádné fungování přístrojů PCR je zaručeno pouze za pokojové teploty.

9.2 Prostorové uspořádání místnosti

Z důvodu vysoké analytické citlivosti PCR je nutno věnovat důkladnou pozornost dodržování čistoty součástí soupravy a vzorků.

PCR znásobí úseky DNA ve vzorku milionkrát až miliardkrát. I to nejmenší množství produktů PCR (které se mohou šířit i formou aerosolu) může způsobit falešný výsledek, pokud dojde k jejich přenosu do materiálu vzorku, do činidel pro ošetření hydrogensířičitanem nebo do činidel PCR v této soupravě.

Proto je čistý a dobře strukturovaný pracovní postup kriticky důležitý pro prevenci nesprávných výsledků. Z toho důvodu je nutné oddělit laboratorní prostory pro přípravu vzorků a vlastní PCR. V každém laboratorním prostoru je třeba zajistit samostatné vybavení, spotřební materiál, laboratorní pláště a rukavice. Laboratorní pláště, rukavice ani vybavení nikdy nepřenášejte z jednoho prostoru do druhého. Obrázek níže ukazuje příklad laboratoře rozdělené na dvě samostatné místnosti. Jeden prostor je určen pouze pro ošetření hydrogensířičitanem a přípravu PCR, zatímco ve druhém se provádí PCR.



Oddělení prostor

Ošetření vzorků hydrogensířičitanem a celá příprava PCR se provádí v 1. místnosti (ideálně v PCR digestoři). Ve 2. místnosti se provádí PCR, detekce a analýza.

9.3 Prevence kontaminace

- Během všech kroků je nutno mít na sobě laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Jednorázové rukavice je třeba vyměňovat často a pokaždé při (podezření na) kontaminaci činidly nebo materiálem vzorku.
- Všechny povrchy, vybavení a materiál je třeba dekontaminovat vhodným čisticím roztokem (činidla působící rozklad DNA).
- Nedotýkejte se vnitřku reakčních zkumavek ani jejich víček.
- Při pipetování vždy používejte špičky s filtrem (beze stop DNázy, RNázy a lidské DNA) k vyloučení zkřížené kontaminace aerosoly, které vznikají během pipetování. Špičky je třeba vždy vyměnit mezi jednotlivými kroky pipetování.
- Je důležité provádět negativní kontroly kvůli detekci případné kontaminace.

9.4 Pokyny k manipulaci

- Nepoužité součásti soupravy uchovávejte v původním balení až do jejich použití.
- Veškeré odstředování se provádí při pokojové teplotě.
- Po ošetření hydrogensířičitanem je možno pracovní postup přerušit. V této fázi lze vzorky uchovávat jeden týden při teplotě 2 °C až 8 °C nebo až dva měsíce při teplotě -15 °C až -30 °C.

- Během celého postupu se nedotýkejte ScreenYu Gyn® Strips a ScreenYu Gyn® Caps bez jednorázových rukavic; v opačném případě mohou vzniknout nespecifické fluorescenční signály.
- ScreenYu Gyn® Strips a ScreenYu Gyn® Caps jsou určena k jednomu použití a nelze je používat opakovaně.
- Nepoužité ScreenYu Gyn® Strips a ScreenYu Gyn® Caps uchovávejte v původním obalu. ScreenYu Gyn® Strips je nezbytně nutné uchovávat tak, aby byly chráněny před světlem.

10 LIKVIDACE

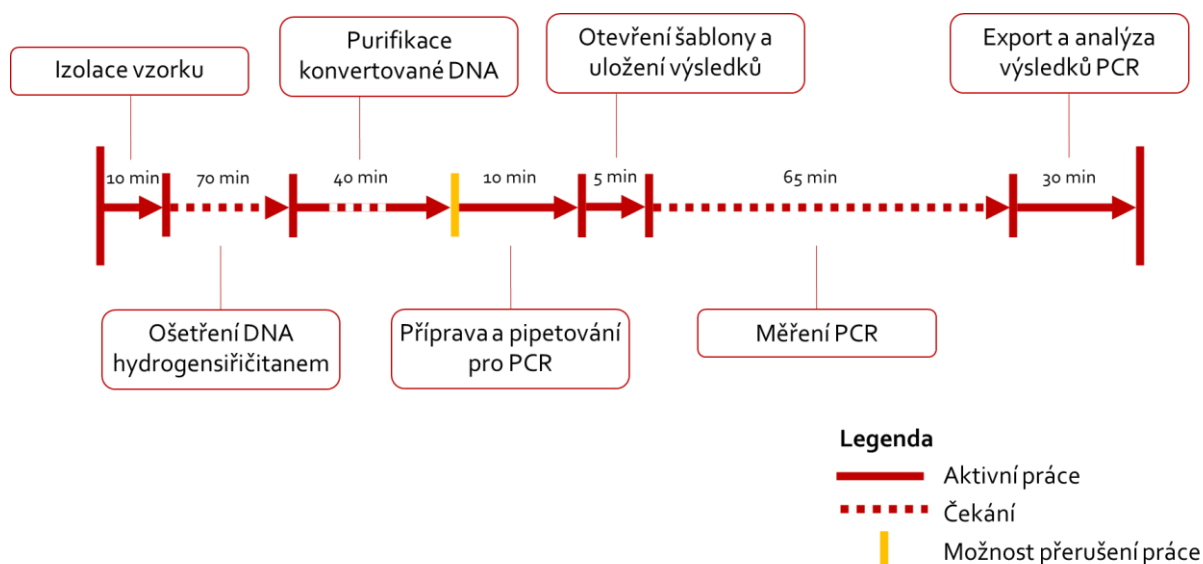
Nepoužité ScreenYu Gyn® Kit a jejich součásti lze zlikvidovat bez zvláštních bezpečnostních opatření. Se vzorky pacientek a použitými reakčními zkumavkami je nutno zacházet jako s infekčním odpadem. Likvidace veškerých činidel musí být v souladu s platnými právními předpisy.

11 POSTUP STANOVENÍ SCREENYU GYN®

Následující kapitola obsahuje podrobný popis jednotlivých kroků zpracování, od odběru vzorků až k analýze údajů.

11.1 Pracovní postup

Celé stanovení ScreenYu Gyn® lze provést během méně než čtyř hodin. Aktivní manipulace vyžaduje zhruba 2 hodiny. Při prvním použití ScreenYu Gyn® si vyhradte 15 minut na vytvoření šablony PCR.



Časový rozvrh pracovního postupu ScreenYu Gyn®

11.2 Odběr vzorků

Odběrová souprava není součástí ScreenYu Gyn® Kit. Lahvičky s roztokem ThinPrep® PreservCyt® (Hologic) a kartáček na odběr vzorků Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) lze koupit od jejich příslušných výrobců. Lékař má provádět odběr cervikálního vzorku podle pokynů výrobce a v souladu s obecně přijímanými zásadami pro odběr vzorků cervikálního stěru [7].

Důležité upozornění: Hlavička kartáčku na odběr vzorků nemá po odběru zůstat v nádobce na vzorek; mohlo by to narušit funkci stanovení ScreenYu Gyn®.

Jako médium pro stěr je nutno použít roztok ThinPrep® PreservCyt®. Spolehlivost stanovení ScreenYu Gyn® nebyla ověřena při použití jiných odběrových médií.

Zajištění dobré kvality vzorku DNA, který se bude používat, je důležitým předpokladem platnosti stanovení. Nesprávný odběr vzorku, ošetření hydrogensířičitanem a uchovávání DNA mohou vést k neplatným nebo i falešně negativním výsledkům.

Cervikální vzorky lze přepravovat k testování do laboratoře bez chlazení. Vzorky lze uchovávat po dobu až 1,5 roku při teplotě 2 °C až 30 °C.

11.3 Příprava vzorku

Následující kroky musí být provedeny v prostoru pro přípravu vzorků (1. místnost).

Důležité upozornění: Pokud je hlavička kartáčku na odběr vzorku uvnitř lahvičky se vzorkem, musíte ji nejdříve vyjmout a zlikvidovat.

- Všechny vzorky pacientky promíchejte na vířivé třepače po 5 sekund při maximální rychlosti a ihned přeneste 1 ml média do 1,5 ml reakční zkumavky.

Upozornění: Buňky se velmi rychle usazují zpět na dno zkumavky. Mezi promícháním vzorku pacientky a odebráním 1 ml vzorku nesmí uplynout více než 10 sekund!

- Odstřeďte vzorky po **5 minut** při **10 000 xg**.
- Opatrně odstraňte 900 µl supernatantu nad peletou, aniž by došlo k narušení pelety.

Upozornění: Peleta může být více či méně tuhá v závislosti na vzorku.

- Peletu resuspendujte promícháním na vířivé třepače po 3 sekundy. Přidejte 20 µl resuspendovaného vzorku k ošetření hydrogensířičitanem. Zbývajících 80 µl zlikvidujte.

11.4 Ošetření vzorků hydrogensířičitanem

Hydrogensířičitanová souprava není součástí ScreenYu Gyn® Kit. Validace stanovení ScreenYu Gyn® byla provedena se soupravou EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH).

- **Množství:** Přidejte **20 µl resuspendovaného vzorku + 130 µl Lightning Conversion Reagent** do 0,5ml reakční zkumavky.
- proveďte konverzi hydrogensířičitanem podle pokynů výrobce soupravy EZ DNA Methylation-Lightning Kit, s výjimkou následujících modifikací:

- Po posledním promytí vyhodte průtok.
- Odstředte kolonu v prázdné Collection-Tube na sběr vzorků po dobu 1 minuty při plné rychlosti, aby zcela vyschla.

Upozornění: Tento krok nevynechávejte, protože zbytky etanolu mohou narušit výkon testu ScreenYu Gyn®.

- Eluujte v **15 µl M-Elution Buffer** po dobu 30 sekund při 8 000 xg.

11.5 PCR

Před zahájením PCR se přesvědčte, že teplotní protokol PCR je naprogramován do vhodného přístroje pro kvantitativní PCR; snižte tak na minimum dobu mezi přípravou a zahájením PCR. Program pro PCR založte na analyzátoru cobas z 480 podle popisu na straně 14. Vysvětlení pro PCR na systému CFX96 Real-Time PCR Detection System najdete na stránce 19 a dále.

11.5.1 Příprava a pipetování PCR reakce

Důležité upozornění: Příprava PCR a pipetování by neměly trvat déle než 60 minut. Tento krok se provádí v 1. místnosti (prostor pro přípravu).

Podívejte se na rozložení destičky popsané na straně 15 nebo na straně 19. Pozitivní kontrola (PC) musí být napipetována do jamky A1 a negativní kontrola (NTC) do jamky B1.

- Ze soupravy vyjměte **ScreenYu Gyn® Mastermix** a požadovaný počet **ScreenYu Gyn® Strips**, které uložíte do 96jamkového držáku.

Upozornění: Jeden **ScreenYu Gyn® Strip** stačí na osm stanovení PCR. Vezměte prosím na vědomí, že pozitivní kontrola a negativní kontrola (voda, NTC) musí být provedeny při každém měření PCR.

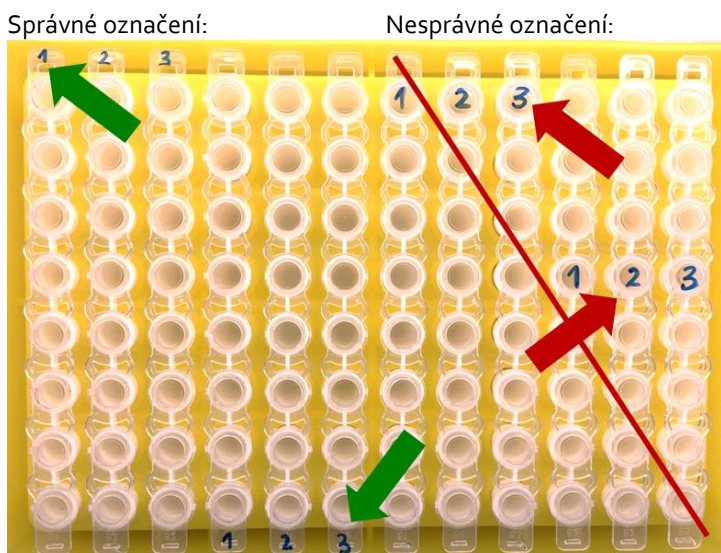
- Promíchejte **ScreenYu Gyn® Mastermix** maximální rychlostí na vířivé třepače po 3 sekundy a krátce odstředte.
- Sejměte **PCR víčka** ze **ScreenYu Gyn® Strips** a zlikvidujte je.
- Přidejte **10 µl** činidla **ScreenYu Gyn® Mastermix** do každé jamky **ScreenYu Gyn® Strips**.
- Eluát vzorku promíchejte na vířivé třepače po 3 sekundy maximální rychlostí a krátce odstředte.
- Přidejte **10 µl vzorku** do jamky naplněné činidlem **ScreenYu Gyn® Mastermix**.

Důležité upozornění: Pro každý krok pipetování vyměňte špičku pipety.

Poznámka: Zbytek vzorků eluátů uchovejte pro případné opakování testu **ScreenYu Gyn® PCR**.

- Promíchejte **ScreenYu Gyn® Positive Control** maximální rychlostí na vířivé třepače po 3 sekundy a krátce odstředte.
- Přidejte **10 µl ScreenYu Gyn® Positive Control** do jamky A1 a **10 µl ScreenYu Gyn® Water** do jamky B1 jako negativní kontrolu.
- Každý **ScreenYu Gyn® Strips** uzavřete nepoužitým **ScreenYu Gyn® Cap** (průhledným sáčkem).

Upozornění: Nedotýkejte se vnitřku **ScreenYu Gyn® Strips** a **ScreenYu Gyn® Caps**. Zkontrolujte, zda je **ScreenYu Gyn® Cap** po uzavření správně nasazeno na **ScreenYu Gyn® Strip**. Kontrola se nejlépe provádí vizuálně z boku.



Upozornění:

Neoznačujte části víček, které jsou přímo nad jamkami, protože signál při PCR je načítán shora skrz víčka, a takové značení by tedy způsobilo nesprávné fluorescenční signály.

Pro označení lze použít jazýček na horním i dolním konci víčka.

- Všechny uzavřené **ScreenYu Gyn® Strips** promíchejte po 3 sekundy maximální rychlostí na vířivé třepače a krátce odstředte.


11.5.2 Provádění PCR na analyzátoru cobas z 480

V následující části je popsáno provádění stanovení ScreenYu Gyn® na systémech pro kvantitativní PCR: na analyzátoru cobas z 480 (označeno modře) a na systému CFX96 Real-Time PCR Detection System (označeno zeleně). Při provozu přístrojů PCR však také vždy dodržujte pokyny výrobce.

PCR provádějte ve 2. místnosti laboratoře.

11.5.2.1 Vytvoření šablony PCR

Pokud jste šablonu PCR vytvořili a uložili dříve, můžete pokračovat bodem 11.5.2.2 *Zahájení měření PCR*.

- Zapněte analyzátor cobas z 480 a odpovídající počítač. Do 15 sekund musíte na obrazovce počítače v BIOSu zvolit možnost „User defined Workflow“, aby se systém přepnul do volně programovatelného režimu.
- Spustíte software a přihlaste se.
- V pracovní liště napravo vyberte „Tools“  a vytvořte nový *Detection Format*. Pojmenujte jej *ScreenYu Gyn*. Vyberte kombinaci filtrů 465–510 540–610 (Excitace–Emise). Okno zavřete kliknutím na tlačítko *Close*.
- Chcete-li vytvořit novou šablonu, zvolte tlačítko *New Experiment*. Na kartě *Run Protocol* nastavte parametr *Detection Format* na *ScreenYu Gyn* a parametr *Reaction Volume* na 20 µl. Naprogramujte teplotní profil podle tabulky níže.

Teplotní protokol PCR na analyzátoru cobas z 480

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

- Šablonu měření uložte pod názvem *ScreenYu Gyn* tak, že vyberete *Apply Template* → *Save as Template* a šablonu uložíte do příslušné složky.

11.5.2.2 Zahájení měření PCR

Pokud jste šablonu PCR uložili dříve, můžete ji nyní vyvolat kliknutím na tlačítko *New Experiment* v modulu *Template* → *ScreenYu Gyn*. Zkontrolujte, zda je nastaven správný teplotní protokol.

- V závislosti na rozložení destičky vyberte *Subset Template* v modulu *Subset Editor*. Uděláte to tak, že stisknete tlačítko „+“, vyberete všechny obsazené jamky v rozložení a šablonu potvrdíte tlačítkem *Apply*. Tento *Subset Template* můžete uložit do příslušné složky pomocí *Apply Template* → *Save as Template*.
- Vyberte vhodné rozložení destičky:

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

Příklad rozložení destičky – šest vzorků pacientek (1–6)

Analýza neúplně obsazené destičky se provádí pomocí definovaného počtu vzorků (subset) v modulu *Subset Editor*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	7	15	23	31	39	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	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	5	13	21	29	37	45						
H	6	14	22	30	38	46						

Příklad rozložení destičky pro 46 vzorků pacientek (1–46)


Analýza neúplně obsazené destičky se provádí pomocí definovaného počtu vzorků v modulu *Subset Editor*.

Důležité upozornění: Rozložení destiček **není** variabilní. Pozitivní kontrola (PC) musí být umístěna do jamky A1 a negativní kontrola (NTC) do jamky B1. Prázdné pozice by měly být vyplněny prázdnými proužky (Balance Strips) pro vyvážení, viz kapitola 7.

- Definujte označení vzorků v modulu *Sample Editor* tak, že vyberete šablonu pro definovaný počet vzorků ve 2. kroku: *Select Samples* → *Subset* a zadáte *Sample Name* ve 3. kroku: *Edit Properties*. Tuto šablonu můžete uložit do příslušné složky pomocí *Apply Template* → *Save as Template*.
- Stripy vložte do přístroje PCR vertikálně v definovaném pořadí.
Důležité upozornění: Použijte adaptér pro PCR stripy (od společnosti Roche Diagnostics GmbH).
- Stisknutím tlačítka „disketa“ (na pravé straně pracovní lišty) uložte měření PCR pod jednoznačným názvem do příslušné složky a spusťte měření PCR kliknutím na tlačítko *Start Run* na kartě *Run Protocol* (*Experiment Editor*).

11.5.2.3 Export dat

Pokud měření PCR analyzujete přímo na počítači analyzátoru cobas z 480, pokračujte bodem 11.5.2.4 *Analýza dat PCR*.

- Po dokončení PCR (*Run complete*) exportujte měření PCR pomocí tlačítka  „Export“ a uložte soubor do příslušné složky.

11.5.2.4 Analýza dat PCR

Následuje popis analýzy exportovaných dat. Tyto pokyny byly vytvořeny pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel. Lze také použít jiné vhodné programy.

- Pokud jste exportovali měření PCR, spusťte na jiném počítači software LightCycler® 480 a otevřete/importujte měření PCR. Jinak můžete analýzu provést na počítači analyzátoru cobas z 480.
- Na kartě *Analysis* vyberte algoritmus analýzy *Abs Quant/Fit Points* a daný subset, pokud je to nutné.
- Na kartě *Cycle Range* nastavte tyto parametry: *First Cycle* 1, *Last Cycle* 42, parametr *Background* na hodnotu 5 až 20, parametr *Min Offset* na hodnotu 4 a parametr *Max Offset* na hodnotu 19.
- Na kartě *Noise Band* zkontrolujte, zda je parametr *STD Multiplier* nastaven na hodnotu 12 a hodnota *Noise Band* je vypočítána automaticky.
- Protože probíhá detekce dvou různých fluorescenčních barviv, analýza dat PCR se provádí zvlášť pro každý marker. Příslušný detekční kanál je vybrán tlačítkem *Filter Comb*:

Kombinace filtrů a nastavení prahových hodnot na analyzátoru cobas z 480

Marker	Detekční kanál	Sonda	Threshold
ACTB	465–510	FAM	1,2
ZNF671	540–610	ROX	0,5

- V kartě *Analysis* zkontrolujte, zda je počet *Fit Points* nastaven na 2.
- Pro **ACTB** vyberte *Filter Comb* **465 - 510**, nastavte *Threshold* na **1,2** a stisknutím tlačítka *Calculate* proveďte analýzu. Vyexportujte tabulku dat jako soubor .txt kliknutím pravým tlačítkem myši na *Export Table* v kartě *Samples* a uložte jej do příslušné složky pod jednoznačným názvem.

- Poté pro **ZNF671** vyberte *Filter Comb 540 - 610*, nastavte *Threshold* na **0,5** a stisknutím tlačítka *Calculate* proveďte analýzu. Vyexportujte tabulku dat jako soubor .txt kliknutím pravým tlačítkem myši na *Export Table* v kartě *Samples* a uložte jej do příslušné složky pod jednoznačným názvem.

Upozornění: Analýzu těchto dvou markerů provádějte vždy po sobě podle popisu, protože program pokaždé aplikuje manuálně nastavené prahové hodnoty na všechny filtry.

- Otevřete tabulkový procesor, např. Microsoft Excel, a zkopírujte do něj všechna data z obou souborů .txt, jak pro marker ZNF671 (vybraný filtr: 540–610), tak i pro marker ACTB (vybraný filtr: 465–510).
- Zformátujte data tak, aby výsledky pro různé vzorky byly zobrazeny pod sebou a markery ZNF671 a ACTB byly zobrazeny vedle sebe.

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

Kontrola platnosti měření PCR

Měření PCR je platné, pokud pozitivní i negativní kontrola splňuje následující kritéria:

Kritéria platnosti kontrol stanovení ScreenYu Gyn®

Marker	Hodnota Cp pro pozitivní kontrolu	Hodnota Cp pro negativní kontrolu
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	žádná hodnota
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	žádná hodnota

Kontrola platnosti vzorků

Výsledek pro vzorek pacientky je platný, pokud kontrolní marker ACTB splňuje následující kritérium:

Kritéria platnosti vzorku pacientky

Marker	Hodnota Cp pro vzorek pacientky
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Analýza stanovení ScreenYu Gyn®

Pokud marker metylace ZNF671

- neposkytne hodnotu Cp, **výsledek** stanovení **ScreenYu Gyn®** pro tento vzorek se bude považovat za **negativní**;
- poskytne hodnotu Cp $> 0; < 20$, **výsledek** stanovení **ScreenYu Gyn®** pro tento vzorek se považuje za **neplatný**;

- poskytne hodnotu $C_p \geq 20$; ≤ 42 , hodnota ΔC_p se vypočítá z následující rovnice:

Výpočet ΔC_p

$$\Delta C_p = C_{pZNF671} - C_{pACTB}$$

Pokud je $\Delta C_p \leq 9,00$, bude výsledek testu ScreenYu Gyn® pro tento vzorek považován za **pozitivní**.

Pokud je $\Delta C_p > 9,00$, bude výsledek testu ScreenYu Gyn® pro tento vzorek považován za **negativní**.

Pozitivní výsledek testu ScreenYu Gyn® je spojený s přítomností cervikální intraepiteliální neoplazie nebo karcinomu děložního čípku. Stanovení ScreenYu Gyn® se nemá pokládat za konečné rozhodnutí o léčbě; je nutné jej analyzovat společně s ostatními klinickými nálezy.

11.5.3 Provádění PCR na systému CFX96 Real-Time PCR Detection System

11.5.3.1 Vytvoření šablony PCR

- Zapněte přístroj PCR.
- Naprogramujte teplotní protokol podle popisu v tabulce níže vybráním a úpravou teplotních kroků a časů.

*Teplotní protokol PCR** na systému 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

* Fluorescenční signál je detekován prostřednictvím „Plate Read“ ve 3. kroku, což symbolizuje symbol kamery.

** V systému CFX96 Real-Time PCR Detection System je výchozí rychlost ohřevu 5 °C/s. Toto nastavení bylo použito při validaci tohoto IVD testu.

- Nastavte objem reakční směsi na 20 µl a teplotu vyhřívání víka na 105 °C.
- Šablonu PCR uložte pod názvem *ScreenYu Gyn*.

11.5.3.2 Zahájení měření PCR

Pokud jste šablonu PCR uložili dříve, můžete ji nyní vyvolat. Zkontrolujte, zda je nastaven správný teplotní protokol.

- **ScreenYu Gyn® Strips** vložte vertikálně do malých jamek topného bloku přístroje PCR. Vyberte vhodné rozložení destičky.

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

Příklad rozložení destičky – 6 vzorků pacientek (1–6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	7	15	23	31	39	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	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						

Příklad rozložení destičky – 46 vzorků pacientek (1–46)

Důležité upozornění: Rozložení destiček **není** variabilní. Pozitivní kontrola (PC) musí být umístěna do jamky A1 a negativní kontrola (NTC) do jamky B1.

Prázdné pozice by měly být vyplněny prázdnými proužky (Balance Strips) pro vyvážení, viz kapitola 7.

- Pojmenujte měření vhodným názvem souboru. Před zahájením měření zkontrolujte, že je vybrána možnost *All Channels*.

11.5.3.3 Export dat

- Po dokončení PCR exportujte měření PCR (soubor .pcrd).

11.5.3.4 Analýza dat PCR

Následuje popis analýzy exportovaných dat.

- Na počítači otevřete software BioRad CFX Maestro a nejdříve nastavte *Plate Type: BR White* v položce *User* → *User Preferences* → *Plate*, čímž uvedete, že se používá bílý plast.
- Importujte soubor .pcrd.
- Definujte rozložení destičky v položce *Plate Setup* → *View/Edit Plate*. Klikněte na tlačítko *Select Fluorophores* a vyberte použitá barviva FAM a ROX. Odpovídající markery ACTB (FAM) a ZNF671 (ROX) lze vybrat v položce *Target Names*. Zadejte název v položce *Sample Names*.
- Neobsazené pozice jsou označeny a mohou být z analýzy vyloučeny zaškrtnutím *Exclude Wells in Analysis*.
- Rozložení destičky potvrďte pomocí *OK*.
- Proveďte nastavení analýzy v položce *Settings*. Parametry v položce *Baseline Threshold* musí být definovány pro každý fluorofor zvlášť. Za tímto účelem je nutno odebrat nebo vybrat markery na kartě *Quantification*.

Nastavení analýzy na systému CFX96 Real-Time Detection System

Parametr	Nastavení
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

- Vyberte všechny vzorky a exportujte data pro oba markery současně v podobě souboru .xlsx pod jednoznačným názvem do příslušné složky kliknutím pravým tlačítkem myši na *Export to Excel*.
- Zformátujte data tak, aby výsledky pro různé vzorky byly zobrazeny pod sebou a markery ZNF671 a ACTB byly zobrazeny vedle sebe.

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

Kontrola platnosti měření PCR

Měření PCR je platné, pokud pozitivní i negativní kontrola splňuje následující kritéria:

Kritéria platnosti kontrol stanovení ScreenYu Gyn®

Marker	Hodnota Cq pro pozitivní kontrolu	Hodnota Cq pro negativní kontrolu
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	žádná hodnota
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	žádná hodnota

Kontrola platnosti vzorků

Výsledek pro vzorek pacientky je platný, pokud kontrolní marker ACTB splňuje následující kritérium:

Kritéria platnosti vzorku pacientky

Marker	Hodnota Cq pro vzorek pacientky
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Analýza stanovení ScreenYu Gyn®

Pokud marker metylace ZNF671

- neposkytne hodnotu Cq, **výsledek** stanovení **ScreenYu Gyn®** pro tento vzorek se bude považovat za **negativní**;
- poskytne hodnotu Cq > 0; < 20, **výsledek** stanovení **ScreenYu Gyn®** pro tento vzorek se považuje za **neplatný**;
- poskytne hodnotu Cq ≥ 20; ≤ 42, hodnota ΔCq se vypočítá z následující rovnice:

Výpočet ΔCq

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

Pokud je $\Delta Cq \leq 10,00$, bude výsledek testu **ScreenYu Gyn®** pro tento vzorek považován za **pozitivní**.

Pokud je $\Delta Cq > 10,00$, bude výsledek testu **ScreenYu Gyn®** pro tento vzorek považován za **negativní**.

Pozitivní výsledek testu ScreenYu Gyn® je spojený s přítomností cervikální intraepiteliální neoplazie nebo karcinomu děložního čípku. Stanovení ScreenYu Gyn® se nemá pokládat za konečné rozhodnutí o léčbě; je nutné jej analyzovat společně s ostatními klinickými nálezy.

12 PARAMETRY STANOVENÍ SCREENYU GYN®

Uvedené údaje pocházejí ze systému CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. Údaje z analyzátoru cobas z 480, které se liší, jsou uvedeny samostatně. Pokud nejsou údaje z analyzátoru cobas z 480 výslovně uvedeny, odpovídají údajům pro systém CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

12.1 Analytické funkce

12.1.1 Analytická citlivost

Analytická citlivost PCR stanovení byla určena pomocí metylované, hydrogensířičitanem konvertované DNA z lidského genomu. Příslušné meze detekce jsou uvedeny v následující tabulce. Série ředění byly testovány v gnásobném stanovení. Ve stanovení bylo pro jeden stěr použito v průměru 120–180 ng DNA.

Analytická citlivost – 1. část

Použitá DNA	Přibližný počet buněk ve stanovení*	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
0,2 ng	30 buněk	9/9	9/9
0,1 ng	15 buněk	9/9	9/9
0,05 ng	7,5 buněk	9/9	9/9
0,02 ng	3 buňky	9/9	9/9
0,01 ng	1,5 buňky	9/9	7/9
0,005 ng	< 1 buňka	5/9	3/9

* jedna buňka obsahuje přibližně 6–7 pg genomické DNA

Mez detekce pro tyto dva markery v systému CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System je celkem 3 buňky (0,02 ng) v celém vzorku.

U analyzátoru cobas z 480 je mez detekce pro tyto dva markery celkem 7,5 buněk (0,05 ng) v celém vzorku.

Meze kvantifikace stanovení ScreenYu Gyn® odpovídají mezím detekce s výslednou linearitou $R^2 = 0,99$ pro oba markery v mezích kvantifikace.

Navíc byla testována směs metylované hydrogensířičitanem konvertované DNA z lidského genomu a nemetylované DNA z lidského genomu. V každém případě bylo použito 20 ng DNA nebo 100 ng DNA na jedno stanovení. Série ředění byly testovány v triplikátu nebo v gnásobném stanovení.

Analytická citlivost – 2. část

Podíl metylované DNA	DNA celkem	Pozitivní ScreenYu Gyn®
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

Mez detekce pro pozitivní výsledek pro marker ZNF671 je 0,1 % metylované DNA u vzorku s celkovým obsahem 20 ng DNA nebo 100 ng DNA na jedno stanovení.

12.1.2 Analytická specifita – detekce nemetylované DNA

Analytická specifita PCR stanovení byla stanovena s použitím nemetylovaných PCR fragmentů o velikosti 10–12 kb reprezentujících lidský genom. Bylo provedeno 5násobné stanovení. Výsledky jsou uvedeny v tabulce níže. Vzorky byly klasifikovány jako platné pomocí markeru ACTB. Žádný falešně pozitivní výsledek stanovení ScreenYu Gyn® se neobjevil až do koncentrace 1000 ng nemetylované hydrogensířičitanem konvertované DNA (biDNA).

Analytická specifita PCR stanovení

Použitá DNA	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
100 ng nemetylované biDNA	0/5	5/5
250 ng nemetylované biDNA	0/5	5/5
500 ng nemetylované biDNA	0/5	5/5
1000 ng nemetylované biDNA	0/5	5/5
1000 ng genomické DNA	0/5	0/5

12.2 Přesnost

12.2.1 Opakovatelnost

Pomocí stanovení ScreenYu Gyn® byly testovány dva hydrogensířičitanem konvertované vzorky pacientek v deseti nezávislých měřeních (4 replikáty od každého). Ve všech 40 stanoveních měl vzorek Pap I negativní výsledek stanovení ScreenYu Gyn® a vzorek CIN3 pozitivní výsledek stanovení ScreenYu Gyn®. Vzorky tedy vykazaly 100% opakovatelnost.

12.2.2 Reprodukovatelnost

Stanovením ScreenYu Gyn® bylo otestováno 20 vzorků pacientek v pěti centrech. Pokaždé byla provedena nová příprava vzorků a jejich ošetření hydrogensířičitanem jinými osobami s použitím jiných přístrojů qPCR (cobas z 480 Analyzer, LightCycler® 480 I, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System).

Ze 20 vzorků pacientek bylo 18 konzistentních. Z toho vyplývá 90% reprodukovatelnost.

12.3 Pravdivost

Pravdivost stanovení ScreenYu Gyn® byla ověřena Sangerovým sekvenováním s použitím 15 vzorků pacientek. Negativně testované vzorky pacientek nevykázaly žádné metylované cytosiny v odpovídající genomické oblasti. Pozitivně testované vzorky pacientek vykazaly správnou genomickou oblast ZNF671 s vysokým stupněm metylace v dané sekvenci.

12.4 Správnost

Správnost je uváděna jako suma přesnosti a pravdivosti stanovení ScreenYu Gyn®.

12.5 Robustnost

U vzorků obohacených buňkami SiHa nebyla pozorována žádná interference po přidání zvýšených koncentrací následujících látek do vzorku:

- až 0,5 % Lugolova roztoku
- až 0,5 % kyseliny octové

12.6 Mezní hodnota

Optimální mezní hodnota stanovení byla určena pomocí tzv. Youdenova indexu. Předpokladem pozitivního výsledku stanovení ScreenYu Gyn® je splnění následujících kritérií:

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

$\Delta Cq_{ZNF671-ACTB} \leq 10 \rightarrow$ výsledek stanovení ScreenYu Gyn® je pozitivní

$\Delta Cq_{ZNF671-ACTB} > 10 \rightarrow$ výsledek stanovení ScreenYu Gyn® je negativní

Analyzátor cobas z 480

$\Delta Cp_{ZNF671-ACTB} \leq 9 \rightarrow$ výsledek stanovení ScreenYu Gyn® je pozitivní

$\Delta Cp_{ZNF671-ACTB} > 9 \rightarrow$ výsledek stanovení ScreenYu Gyn® je negativní

12.7 Parametry při klinickém použití

Zde použité vzorky pacientek byly získány z evropských klinik (Německo, Portugalsko).

Ošetření vzorků pacientek hydrogensířičitanem pomocí soupravy EZ DNA Methylation-Lightning Kit bylo prováděno při rychlosti odstředování 18 000 xg a době desulfonace o délce 20 minut.

Pro vyhodnocení parametrů stanovení ScreenYu Gyn® při klinickém použití bylo zkoumáno 616 vzorků pacientek s následujícím rozdělením prevalence nálezů: Pap I (n = 380; 61,7 %), CIN 1 (n = 47; 7,6 %), CIN 2 (n = 50; 8,1 %), CIN 3 (n = 132; 21,4 %), karcinom děložního čípku (n = 7; 1,1 %). Neplatná vzorkovací frekvence činila 1,3 % (n = 8).

Klinická citlivost a specifická byla vypočteny na základě stanovené mezní hodnoty.

Vyhodnocení parametrů stanovení ScreenYu Gyn® při klinickém použití

Nálezy podle cytologie / histologie	Detekce	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 %

Údaje při klinickém použití pro CIN 3+ / Pap I	Hodnota	CI 95 %
Citlivost	64,75 %	56,2 % – 72,7 %
Specifická	90,67 %	87,3 % – 93,4 %
Pozitivní prediktivní hodnota	72,00 %	63,3 % - 79,7 %
Negativní prediktivní hodnota	87,40 %	83,7 % – 90,5 %
Pozitivní věrohodnostní poměr	6,96	–
Negativní věrohodnostní poměr	0,39	–

CI = interval spolehlivosti

13 MEZE TOHOTO POSTUPU

- Interpretaci výsledků stanovení ScreenYu Gyn® je třeba vždy provádět v souvislosti s výsledky dalších laboratorních diagnostických postupů, a také přitom zohlednit klinický obraz.
- Aby nevznikly chybné výsledky, je nezbytné dodržovat specifikace podle návodu k použití, např. pipetované objemy, inkubační doby, teploty a kroky přípravy.
- Správný způsob odběru vzorků a jejich uchovávání jsou kriticky důležité faktory pro výsledky testu.
- U molekulárně-biologických testů nelze z principu vyloučit, že další, velmi vzácné varianty sekvencí mohou ovlivnit výsledek testu, protože ještě nejsou obsaženy ve zdrojích použitých pro analýzu specifity a citlivosti primerů a sond.
- Provoz přístrojů mimo specifikaci, jakož i odchylky od popsaného testovacího postupu, uvedených podmínek uchovávání, materiálu, vybavení nebo doporučeného materiálu vzorků, mohou mít za následek rozdíly oproti dosaženým výsledkům při splnění všech specifikací.
- Poskytnuté interní a externí kontroly jsou pomůcky ke zjištění chyb. Nemohou však detekovat všechny možné chyby. Uživatel je odpovědný za validaci všech případně provedených modifikací nebo – pokud je to nutné – použitých přístrojů, tak aby byla zajištěna shoda se specifikacemi přístrojů.

14 LITERATURA

- [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.* Volume 9, Issue 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] International Agency for Research on Cancer (2008). European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening – Second edition

15 PRÁVNÍ ODPOVĚDNOST

Souprava ScreenYu Gyn® Kit se smí používat pouze v souladu s jejím určeným účelem. Společnost Epitype GmbH nepřebírá odpovědnost za žádné jiné použití (např. nedodržení tohoto návodu k obsluze a nesprávné použití) a případné škody z toho vyplývající.

16 DOTAZY A PROBLÉMY

Pokud máte nějaké dotazy nebo problémy související s tímto výrobkem, obraťte se prosím na svého zástupce společnosti Epitype GmbH.

Technickou podporu společnosti Epitype GmbH zastihnete od pondělí do pátku mezi 8:00 a 16:00 na následujícím telefonním čísle: +49 (0) 3641 5548500

Mimo pracovní dobu nám pošlete e-mail na adresu: support@epitype.de

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

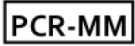















01109 Dresden (Drážďany), Deutschland (Německo)

Výkonní ředitelé: Dr. Alfred Hansel, Dr. Martina Schmitz, Dr. Timm Zörgiebel

17 DALŠÍ POZNÁMKY

- Regulační oznámení zákazníkům v Evropské unii: Vezměte prosím na vědomí, že jste povinni oznámit příslušnému úřadu a společnosti Epitype GmbH všechny závažné incidenty, ke kterým dojde v souvislosti s výrobkem.
- Aktuální verze bezpečnostního listu pro tento výrobek je dostupná ke stažení na webových stránkách (<https://www.epitype.de/en/downloadcenter/>), nebo si ji můžete vyžádat e-mailem na adrese support@epitype.de.

18 VÝZNAM SYMBOLŮ

Symbol	Význam	Symbol	Význam
	Mastermix		Teplota uchovávání
	PCR stripy		Pokud jsou neotevřené, jsou použitelné do (RRRR-MM-DD)
	Víčka		Obsah postačuje pro <n> testů
	Pozitivní kontrola		Výrobce
	Voda		Dodržujte návod k použití
	<i>in vitro</i> diagnostikum		Chraňte před slunečním světlem
	Označení šarže		Nepoužívejte opakovaně
	Referenční číslo		Označení CE

19 SEZNAM ZMĚN

Předchozí verze (Datum vydání)	Změny
8 (2025-09)	<p>Oprava překladatelských chyb:</p> <ul style="list-style-type: none">- Oprava nadpisů kapitol<ul style="list-style-type: none">• 12.2 Preciznost → Přesnost• 12.3 Přesnost → Pravdivost• 12.4 Preciznost → Správnost- Oprava vět v kapitole 12.3:<ul style="list-style-type: none">• Pravdivost stanovení ScreenYu Gyn® byla ověřena Sangerovým sekvenováním s použitím 15 vzorků pacientek.- Oprava vět v kapitole 12.4:<ul style="list-style-type: none">• Správnost je uváděna jako suma přesnosti a pravdivosti stanovení ScreenYu Gyn®. <p>Optimalizace zápatí v krátkém protokolu, odkaz na verzi IFU</p>

20 ZKRÁCENÝ PROTOKOL

Níže najdete šablonu stručného návodu ve formě kontrolního seznamu.

Před použitím stručného návodu si důkladně přečtěte pokyny pro použití podrobně popsané v kapitole 11 včetně všech poznámek.

Hydrogensířičitanová souprava není součástí ScreenYu Gyn® Kit. Ošetření vzorků hydrogensířičitanem se musí provádět s použitím soupravy EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD) (referenční informace najdete v kapitole 7).

Příprava vzorků

- Vzorky pacientek promíchejte na vířivé třepačce po 5 sekund při maximální rychlosti a přeneste 1 ml do 1,5ml reakční zkumavky.
- Odstředte vzorky po 5 minut při 10 000 xg.
- Odstraňte a zlikvidujte 900 µl supernatantu nad peletou.

Ošetření vzorků hydrogensířičitanem

- Připravte soupravu EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) podle pokynů výrobce.
- Resuspendujte peletu.
- Připravte reakci v 0,5ml reakční zkumavce, promíchejte na vířivé třepačce a odstředte.

Reakce pro konverzi hydrogensířičitanem

Součást	Na reakci
Lightning Conversion Reagent	130 µl
Resuspendovaný vzorek	20 µl
Celkový objem	150 µl

- provedte bisulfitovou úpravu podle pokynů výrobce pro EZ DNA Methylation-Lightning Kit a postupujte podle dalších kroků:
- Po posledním promytí vylijte průtokovou tekutinu.
- Odstředte kolonu v prázdné Collection-Tube po dobu 1 minuty při plné rychlosti, aby zcela vyschla.
- Přeneste kolonu do 1,5ml reakční zkumavky.
- Pipetujte 15 µl M-Elution Buffer na kolonu a odstředte při 8 000 xg po dobu 30 sekund.

Příprava a pipetování PCR reakce

- Odstředte vzorek.
- Promíchejte činidlo ScreenYu Gyn® Mastermix na vířivé třepačce a odstředte.
- Odstraňte PCR uzávěry ze ScreenYu Gyn® Strips a zlikvidujte je.
- Napipetujte do jamek 10 µl činidla ScreenYu Gyn® Mastermix.
- Napipetujte 10 µl vzorku anebo ScreenYu Gyn® Positive Control (do jamky A1) nebo ScreenYu Gyn® Water (do jamky B1).
- Uzavřete ScreenYu Gyn® Strips nepoužitými ScreenYu Gyn® Caps (průhledný sáček).
- Promíchejte ScreenYu Gyn® Strips na vířivé třepačce a odstředte.

Provedení PCR

- Zapněte přístroj pro kvantitativní PCR, spusťte software, pokud je to nutné, a vyberte šablonu ScreenYu Gyn.
- Zadejte individuální název PCR měření, upravte rozložení vzorku na destičce a zkontrolujte teplotní protokol.

Teplotní protokol PCR

Programme Name	Number of cycles	Temperature	Time (m:ss)
Inicializace	1 X	94 °C	1:00
Amplifikace	42X	94 °C	0:15
		61 °C	0:30
Chlazení	1 X	37 °C (analyzátor cobas z 480)	1:00
		30 °C (CFX96 Real-Time PCR Detection System)	

- Založte do přístroje ScreenYu Gyn® Strips a spusťte měření PCR.

Vyhodnocení a interpretace dat PCR

- Otevřete exportovaný soubor a seřadíte data ve vhodném tabulkovém procesoru.
- Zformátujte data tak, aby výsledky pro různé vzorky byly zobrazeny pod sebou a markery ZNF671 a ACTB byly zobrazeny vedle sebe.
- Zkontrolujte výsledky pozitivní kontroly a negativní kontroly u obou markerů.
- Analyzujte výsledek pro odebrané vzorky.

Vzorek se pokládá za pozitivní při stanovení ScreenYu Gyn®, pokud jsou splněna následující kritéria:

Kritéria platnosti a positivity

Přístroj PCR	Marker	Hodnota Ct	$\Delta Ct_{ZNF671 - ACTB}$
cobas z 480 Analyzer	ACTB	$\geq 20, \leq 32$	–
	ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 9,00$
CFX96 Real-Time PCR Detection System	ACTB	$\geq 20, \leq 32$	–
	ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 10,00$

Pozitivní výsledek testu ScreenYu Gyn® je spojený s přítomností cervikální intraepiteliální neoplazie nebo karcinomu děložního čípku. Stanovení ScreenYu Gyn® se nemá pokládat za konečné rozhodnutí o léčbě; je nutné jej analyzovat společně s ostatními klinickými nálezy.