



ScreenYu Gyn®

Grunnleggende UDI-DI: 426076785SCREENYUGYNP6

Bruksanvisning



SG001-46



Opptil 46 prøver

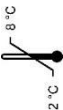
UDI-DI

4260767852212

Les disse bruksanvisningene nøye før du bruker testen, og følg dem nøye for å sikre pålitelige resultater.



ScreenYu Gyn® er et in vitro diagnostisk kit for kvalitativ påvisning av en human epigenetisk markør i bisulfit-konvertert DNA fra livmorhalsprøver fra kvinner med positiv HPV-test eller unormal cytologi som krever oppfølging. Et positivt resultat med ScreenYu Gyn® er assosiert med tilstedeværelse av cervikal intraepitelial neoplasi eller livmorhalskreft.



Skal kun brukes til in vitro-diagnostikk (IVD) av opplært personell.

Revisjons 9 (2026-02)
Oversettelse utgitt 2026-02



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



OPPBEVARES UMIDDELBART ETTER LEVERING

ScreenYu Gyn® Kit sendes ved romtemperatur, og temperaturmålemerket brukes til å overvåke om det godkjente temperaturområdet overskrides. Umiddelbart etter mottakelse må du kontrollere temperaturmålemerket som er festet til kittet og bekrefte om fargen har endret seg. Kontroller også ytteremballasjen, forseglingen og primæremballasjen og bekreft at de ikke er skadet. Settet må kjøles ned umiddelbart etter mottakelse til en temperatur mellom 2 °C og 8 °C og beskyttes mot lys. Hvis ScreenYu Gyn® Kit og dets komponenter transporteres og oppbevares på riktig måte, kan de brukes frem til den angitte datoen.



Overvåking av transporttemperaturen

Temperaturmålemerket som er festet til ScreenYu Gyn® Kit, overvåker temperaturen under transport. Et lys sølvmerke indikerer at kitet ble levert i samsvar med transporttemperaturen. Et svart merke beviser at den angitte transporttemperaturen ikke er overholdt, noe som betyr at ytelsesparametrene til ScreenYu Gyn® Kit ikke lenger kan garanteres. I dette tilfellet, vennligst kontakt Epitype GmbH.

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Tiltenkt bruk	4
2	Klinisk betydning	4
3	Testprinsipp	4
4	ScreenYu Gyn® Assay Design	5
4.1	ScreenYu Gyn® Strips	5
4.2	Kontroller.....	5
4.2.1	Kvalitetskontroll bisulfittbehandling (kontrollmarkør ACTB)	5
4.2.2	Positiv kontroll	5
4.2.3	Negativ kontroll	6
5	Referansemateriale.....	6
6	Innhold i settet	6
7	Forbruksvarer og utstyr (ikke inkludert i settet)	7
8	Oppbevaring og holdbarhet	8
9	Sikkerhetsinstruksjoner	8
9.1	Generell informasjon.....	8
9.2	Anbefalt arbeidsflyt	9
9.3	Unngå forurensning	9
9.4	Håndteringsinstruksjoner.....	9
10	Avfall.....	10
11	ScreenYu Gyn®-prosedyre.....	11

11.1	Arbeidsflyt	11
11.2	Prøvetaking.....	11
11.3	Prøveforberedelse.....	12
11.4	Bisulfittbehandling av prøver	12
11.5	PCR.....	13
11.5.1	Forberedelse og pipettering av PCR	13
11.5.2	Utføre PCR- en på cobas z 480 Analyzer.....	14
11.5.3	Utføre PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems	19
12	ScreenYu Gyn® ytelse	23
12.1	Analytisk ytelse.....	23
12.1.1	Analytisk følsomhet	23
12.1.2	Analytisk spesifisitet – påvisning av umetylert DNA.....	24
12.2	Presisjon	25
12.2.1	Repeterbarhet.....	25
12.2.2	Reproduserbarhet	25
12.3	Riktighet	25
12.4	Nøyaktighet	25
12.5	Robusthet	25
12.6	Cut-off-verdi (Grenseverdi)	25
12.7	Klinisk ytelsesevaluering	26
13	Begrensninger ved prosedyren	27
14	Referanser	27
15	Ansvar.....	27
16	Spørsmål og problemer.....	28
17	Ytterligere merknader.....	28
18	Betydningen av symbolene	28
19	Liste over endringer	29
20	Kort protokoll.....	29

1 TILTENKT BRUK

ScreenYu Gyn® er et in vitro diagnostisk kit for kvalitativ påvisning av en human epigenetisk markør i bisulfitt-konvertert DNA fra livmorhalsprøver fra kvinner med positiv HPV-test eller unormal cytologi som krever oppfølging. Et positivt resultat med ScreenYu Gyn® er assosiert med tilstedeværelse av cervical intraepitelial neoplasia eller livmorhalskreft.

ScreenYu Gyn® er kun beregnet for bruk av kvalifisert laboratoriepersonell som er kjent med molekylærbiologiske teknikker. Tolkningen av resultatene bør alltid utføres i sammenheng med resultatene fra ytterligere laboratoriediagnostiske prosedyrer, samt under hensyntagen til det kliniske bildet.

2 KLINISK BETYDNING

Livmorhalskreft er den fjerde vanligste kreftformen hos kvinner over hele verden, med over 600 000 nye tilfeller årlig [1]. I praktisk talt alle tilfeller er vedvarende infeksjon med kreftfremkallende humant papillomavirus (HPV) den underliggende årsaken [2] og en forutsetning for utvikling av livmorhalskreft. HPV-negative kvinner har en ekstremt lav risiko for å utvikle livmorhalskreft, men selv de fleste kvinner med HPV-infeksjon utvikler ikke et forstadie til kreft. Bare om lag 15 % av kvinner som er smittet med HPV, utvikler faktisk et forstadie til kreft eller karsinom som krever behandling [3].

Pasienter med et positivt HPV-testresultat og/eller med Pap-funn som må avklares (Pap II, Pap III og Pap III D1 og D2) anbefales derfor å bruke en triagetest som ScreenYu Gyn® for å fastslå sannsynligheten for forekomst av kreft eller forstadier med høy nøyaktighet.

ScreenYu Gyn® bør ikke betraktes som den endelige terapeutiske beslutningen og må analyseres i sammenheng med andre medisinske funn.

3 TESTPRINSIPP

ScreenYu Gyn® er basert på påvisning av en epigenetisk biomarkør, dvs. metylering av en spesifikk DNA-seksjon, hvis tilstedeværelse korresponderer med tilstedeværelsen av forstadier til kreft eller livmorhalskreft [4, 5, 6]. I tillegg analyseres en bisulfittspesifikk referansemarkør. Markørregionene som brukes, er vist i tabellen nedenfor.

Oversikt over markørregioner

Betegnelse i protokollen	Markørregion (genbetegnelse)	Fluorescerende fargestoff
Metylasjonsmarkør	ZNF671	ROX
Kontrollmarkør	ACTB	FAM

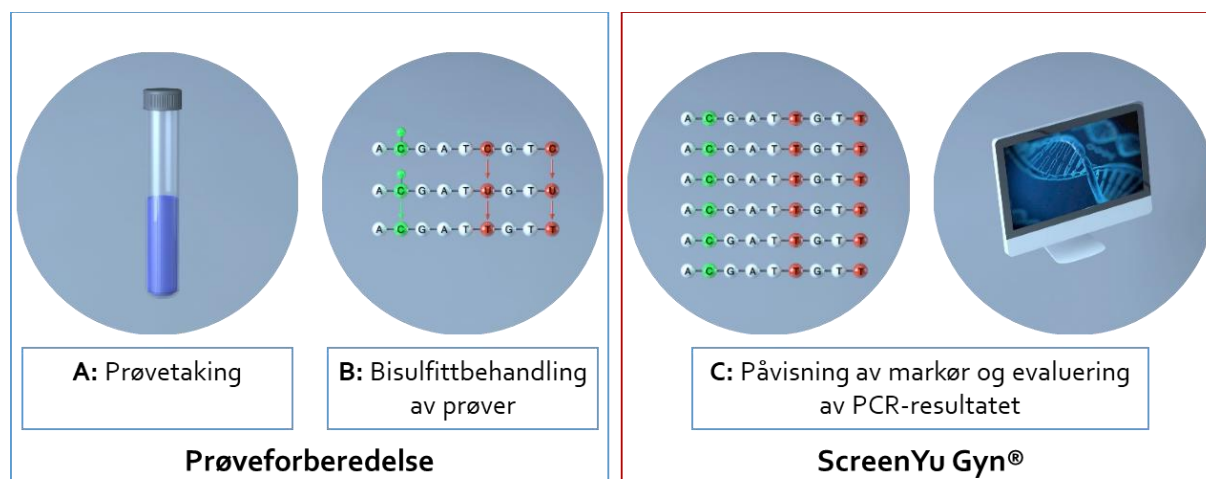
Deteksjonen utføres ved hjelp av den svært følsomme probe-baserte Real-Time PCR-metoden. Resultatet fra Real-Time-instrumentene er Cp-verdien (Cross point, cobas z 480 Analyzer) eller Cq-verdien (Cycle quantification, CFX96 Real-Time PCR Detection Systems), som begge tilsvarer syklusterskelverdien Ct og også refereres til som sådan nedenfor. Denne verdien tilsvarer syklusen i en Real-Time PCR, hvor fluorescensen stiger over en definert terskelverdi for første gang.

Analysen av en pasientprøve ved hjelp av ScreenYu Gyn® omfatter to trinn.

Først omdannes DNA fra livmorhalsprøven ved hjelp av bisulfitt, og metyleringen fikseres. I det andre trinnet analyseres det eluerte, bisulfittbehandlede DNAet i en metyleringsspesifikk, probe-basert Real-Time PCR. Den opprinnelig metylerte DNA-delen forsterkes selektivt ved hjelp av primere i

ScreenYu Gyn® Strips. Deteksjonen av metylerings- og kontrollmarkøren utføres ved hjelp av -prober merket med fluorescerende fargestoffer. I tillegg er en positiv og en negativ kontroll inkludert for å bekrefte PCR. Deretter utføres den assay-spesifikke analysen.

Prøvetakings- og bisulfitt-settet er ikke en del av ScreenYu Gyn® Kit. Produkter som er spesielt utviklet for prøvetaking og bisulfittbehandling, er tilgjengelige separat.



Testprinsipp

A: Gynekologen tar en utstryk fra pasientens livmorhals ved hjelp av et egnet prøvetakingssett.

B: Diagnostikklaboratoriet utfører bisulfittbehandling på pasientprøven.

C: Det utføres én duplex-PCR-reaksjon per prøve. Analysen utføres ved å påvise de fargestoffmerkede prober som finnes i ScreenYu Gyn® Strip.

4 SCREENYU GYN® ASSAY DESIGN

4.1 ScreenYu Gyn® Strips

ScreenYu Gyn® er en TaqMan-probe-basert assay. En ScreenYu Gyn® Strip er en PCR-stripe med 8 brønner som inneholder to primerpar i hver brønn, samt en tilhørende probe for amplifisering av den metyleringsspesifikke markøren ZNF671 og kontrollmarkøren ACTB. Én brønn av en ScreenYu Gyn® Strip er nødvendig for analyse av en pasientprøve.

4.2 Kontroller

ScreenYu Gyn® Kit inneholder tre kontroller for å overvåke prøvekvaliteten og bisulfittbehandlingen (ACTB-markør), samt kvaliteten på PCR-reaksjonen (positiv kontroll og negativ kontroll).

4.2.1 Kvalitetskontroll bisulfittbehandling (kontrollmarkør ACTB)

Denne kontrollmarkøren verifiserer vellykket konvertering av alle ikke-metylerede cytosiner til uracil og dermed kvaliteten på den utførte bisulfittbehandlingen. Deteksjon utføres ved amplifisering av et DNA-fragment nær det humane genet beta-aktin (ACTB). Hvis det ikke er noen ACTB-amplifisering med en Ct-verdi under 32, anses analysen av prøven som ugyldig og må gjentas.

4.2.2 Positiv kontroll

Den positive kontrollen overvåker kvaliteten på PCR. Amplifikasjonen av ScreenYu Gyn® Positive Control (PC) skal gi en Ct-verdi under 38 for både metyleringsmarkøren og kontrollmarkøren. Ellers er PCR ugyldig og må gjentas.

4.2.3 Negativ kontroll

Den negative kontrollen er en kontrollreaksjon med ScreenYu Gyn® Water (NTC – No Template Control) som mal, som må være negativ i begge markørene. Hvis Ct-verdier forekommer i den negative kontrollen, er det svært sannsynlig at det foreligger forurensning, og ScreenYu Gyn®-analysen må gjentas.

5 REFERANSEMATERIALE

Det finnes ikke noe internasjonalt referansemateriale.

6 INNHOLD I SETTET

Innhold i ScreenYu Gyn® Kit

Betegnelse på komponenter	Symbol	Innhold	Volum/Mengde SGo01-46
ScreenYu Gyn® Mastermix		PCR Mastermix ¹ (2x)	1 x 0,55 ml
ScreenYu Gyn® Strips		PCR-stripe ²	6 striper
ScreenYu Gyn® Caps		Kapsel til stripe	6 kapsler
ScreenYu Gyn® Positive Control		Positiv kontroll	1 x 90 µl
ScreenYu Gyn® Water		Vann	1 x 2 ml
Bruksanvisning	-	Bruksanvisning	1

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

² Inneholder primere og prober som kreves for PCR.

7 FORBRUKSVARER OG UTSTYR (IKKE INKLUDERT I SETTET)

ScreenYu Gyn® kan kun brukes sammen med de oppførte forbruksartiklene og utstyret, og kun av kvalifisert personell. Alt nødvendig laboratorieutstyr må installeres, kalibreres, håndteres og vedlikeholdes i henhold til produsentens instruksjoner.

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

Nødvendig utstyr

Utstyr	Katalognr.	Selskap
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® eller Cervex-Brush® Combi	-	Rovers Medical Devices

* Skal brukes som Balance Strips i PCR, se plateoppsett på side 15 eller side 19 .

Følgende laboratorieutstyr og forbruksvarer er nødvendige for å utføre ScreenYu Gyn®-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)
 - Reaksjonsrørstativ for 0,5 ml/1,5 ml/2 ml reaksjonsrør
 - 96-brønns stativ for PCR-strips
 - Reaksjonsrør for 0,5 ml/1,5 ml (DNase-frie)
 - Etanol 96–100 %, udenaturert
 - Realtids-PCR-enhet, deteksjonskanaler for probekjemikaliene FAM og ROX
- ScreenYu Gyn® er validert på følgende realtids-PCR-enheter:
- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) med 96-brønnsblokk, adapter for PCR-strips og LightCycler® 480 Software 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 Software versjon 2.3

8 OPPBEVARING OG HOLDBARHET

Ved riktig transport og oppbevaring kan ScreenYu Gyn® Kit og dets komponenter 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.

Oppbevaringstemperatur for ScreenYu Gyn® Kit og utstyr som ikke er inkludert i settet

Utstyr	Lagringstemperatur
ScreenYu Gyn® Kit	2 °C til 8 °C
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE IVD)	15 °C til 30 °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:

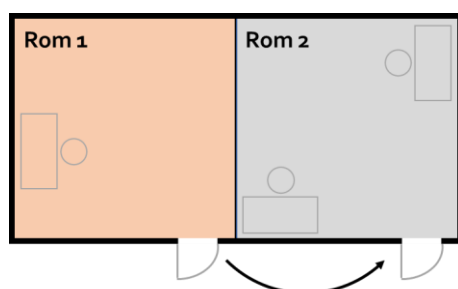
- Da dette kit omfatter molekylærbiologiske prosesser, som bisulfittbehandling, amplifikasjon og påvisning av DNA, er det kun beregnet for in vitro-diagnostikk og skal kun brukes av personell som er opplært i laboratoriepraksis for in vitro-diagnostikk.
- Les bruksanvisningen nøye før du bruker produktet. 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 ScreenYu Gyn® hvis reagentemballasjen er skadet. Kontakt distributøren din.
- Ikke bruk ScreenYu Gyn® 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 settet 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 av for eksempel 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 settet.

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. Separat utstyr, forbruksvarer, laboratoriefrakker og hansker bør være tilgjengelig i hvert område. Overfør aldri laboratoriefrakker, hansker eller utstyr fra ett område til et annet. Figuren nedenfor 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.



Romlig inndeling

Bisulfittbehandlingen av prøvene samt hele PCR-forberedelsen utføres i rom 1 (bruk av PCR-hette er optimalt). I rom 2 utføres, detekteres og analyseres PCR.

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 skal alltid skiftes mellom pipetteringstrinnene.
- Det er viktig å utføre negative kontroller for å oppdage mulig forurensning.

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.
- ScreenYu Gyn® Strips og ScreenYu Gyn® Caps skal ikke berøres uten engangshansker under hele prosedyren, da det ellers kan oppstå uspesifikke fluorescenssignaler.
- ScreenYu Gyn® Strips og ScreenYu Gyn® Caps er beregnet for engangsbruk og kan ikke gjenbrukes.

- Oppbevar ubrukte ScreenYu Gyn® Strips og ScreenYu Gyn® Caps i originalemballasjen. Det er viktig at du oppbevarer ScreenYu Gyn® Strips beskyttet mot lys.

10 AVFALL

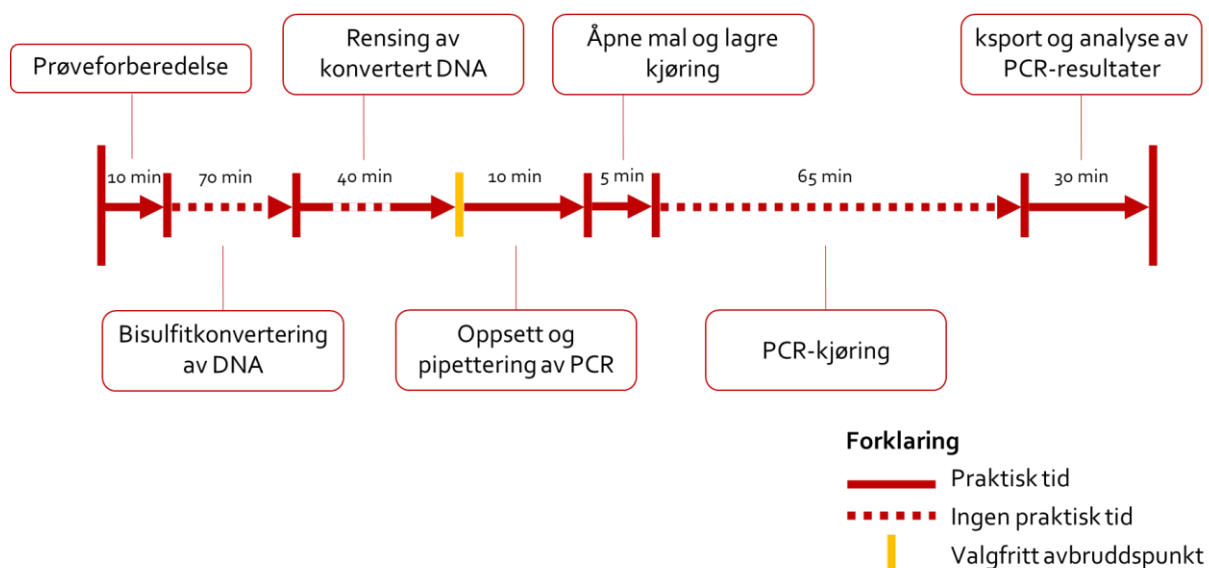
Ubrukte ScreenYu Gyn® Kit og komponenter kan kastes uten spesielle forholdsregler. Pasientprøver og brukte reaksjonsrør må håndteres som smittefarlig avfall. Alle reagenser må kastes i henhold til lovbestemte forskrifter.

11 SCREENYU GYN®-PROSEDYRE

Følgende kapittel inneholder en detaljert beskrivelse av de ulike trinnene fra prøvetaking til dataanalyse.

11.1 Arbeidsflyt

Totalt kan ScreenYu Gyn® utføres på mindre enn fire timer. Den aktive arbeidstiden er omtrent 2 timer. Under den første ScreenYu Gyn®-prosedyren bør det avsettes 15 minutter til å lage PCR-malen.



Tidslinje for ScreenYu Gyn®-arbeidsflyten

11.2 Prøvetaking

Prøvetakingssettet er ikke inkludert i ScreenYu Gyn® Kit. ThinPrep® PreservCyt®-vials (Hologic, Inc.) og Cervex-Brush®-prøvetakingsutstyr (Rovers Medical Devices) er tilgjengelig ved å kontakte 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: Børstehode på prøvetakingsutstyret skal ikke forbli i prøvebeholderen etter prøvetaking, da dette vil svekke ytelsen til ScreenYu Gyn®.

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

Det er viktig å sikre at DNA-prøven er av god kvalitet for at analysen skal være gyldig. Feil prøvetaking, bisulfittbehandling 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 temperaturer mellom 2 °C og 30 °C.

11.3 Prøveforberedelse

Følgende trinn må utføres i prøveforberedelsesområdet (rom 1).

Viktig: Hvis børstehode på prøvetakingsbørsten befinner seg inne i prøveflasken, må den først fjernes og kastes.

- Vortex alle pasientprøver i 5 sekunder på maksimal hastighet og overfør umiddelbart 1 ml av mediet til et 1,5 ml reaksjonsrør.

Forsiktig: Cellene legger seg raskt på bunnen av røret. Det må ikke gå mer enn 10 sekunder mellom blanding av pasientprøven og uttak av 1 ml prøve!

- Sentrifuger prøvene i **5 minutter** ved **10 000 xg**.
- Fjern forsiktig 900 µl supernatant over pellet uten å ødelegge pellet.

Forsiktig: Avhengig av prøvens beskaffenhet, er pellet mer eller mindre fast.

- Resuspender pellet ved å vortexere i 3 sekunder. Tilsett 20 µl av den resuspenderte prøven til bisulfittbehandlingen. Kast de resterende 80 µl.

11.4 Bisulfittbehandling av prøver

Bisulfitt-settet er ikke inkludert i ScreenYu Gyn® Kit. ScreenYu Gyn® Kit er validert med EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH).

- **Inngang:** Tilsett **20 µl** av den **resuspenderte prøven** + **130 µl Lightning Conversion Reagent** til et 0,5 ml reaksjonsrør.
- Utfør bisulfittbehandling i henhold til produsentens instruksjoner for EZ DNA Methylation-Lightning Kit, med unntak av følgende modifikasjoner:

- Kast gjennomstrømningen etter det siste vasketrinnet.
- Sentrifuger kolonnen i det tomme Collection-Tube i **1 minutt** på **full hastighet** for å tørke den helt.

Oppmerksomhet: Ikke hopp over dette trinnet, da rester av etanol kan svekke ytelsen til ScreenYu Gyn®-analysen.

- Eluer i **15 µl M-Elution Buffer** i **30 sekunder** ved **8000 xg**.

11.5 PCR

Før du starter PCR, må du sørge for 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 14 . Forklaringen for PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems finnes på side 19 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 15 eller 19 . Den positive kontrollen (PC) må pipetteres i brønn A1 og den negative kontrollen (NTC) i brønn B1.

- Ta **ScreenYu Gyn® Mastermix** og det nødvendige antallet **ScreenYu Gyn® Strips** ut av settet og legg dem på et 96-brønns stativ.

Forsiktig: Én **ScreenYu Gyn® Strip** er tilstrekkelig for åtte PCR-analyser. Vær oppmerksom på at det må utføres en positiv kontroll og en negativ kontroll (vann, NTC) for hver PCR-kjøring.

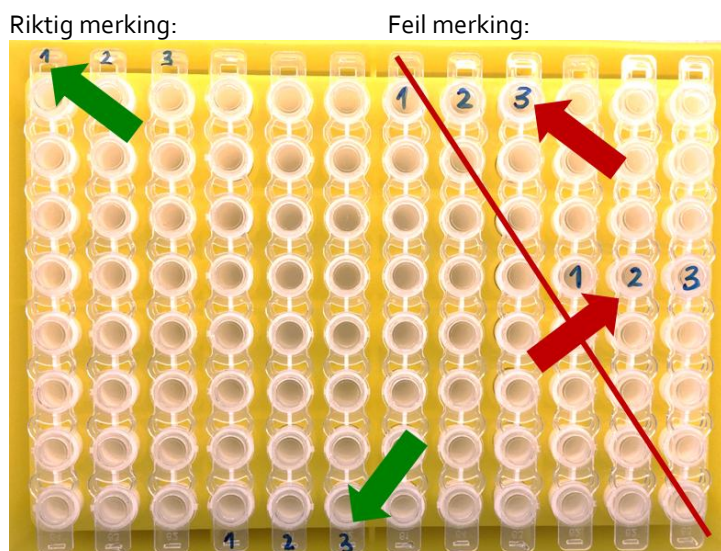
- Vortex **ScreenYu Gyn® Mastermix** i 3 sekunder på maksimal hastighet og sentrifuger den av.
- Fjern **PCR-lokkene** fra **ScreenYu Gyn® Strips** og **kast** dem.
- Tilsett **10 µl ScreenYu Gyn® Mastermix** til hver brønn i **ScreenYu Gyn® Strip**.
- Vortex prøveeluatet i 3 sekunder ved maksimal hastighet og sentrifuger kort.
- Tilsett **10 µl av prøven** til brønnen fylt med **ScreenYu Gyn® Mastermix**.

Viktig: Bytt pipettespiss for hvert pipetteringstrinn.

Merk: Oppbevar resten av prøveeluatene for en gjentakelse av **ScreenYu Gyn® PCR** om nødvendig.

- Vortex **ScreenYu Gyn® Positive Control** i 3 sekunder ved maksimal hastighet og sentrifuger den av.
- Tilsett **10 µl ScreenYu Gyn® Positive Control** til brønn A1 og **10 µl ScreenYu Gyn® Water** til brønn B1 som negativ kontroll.
- Lukk hver **ScreenYu Gyn® Strip** med en ubrukt **ScreenYu Gyn® Cap** (gjennomsiktig pose).

Forsiktig: Ikke berør innsiden av **ScreenYu Gyn® Strips** og **ScreenYu Gyn® Caps**. Forsikre deg om at **ScreenYu Gyn® Cap** sitter ordentlig på **ScreenYu Gyn® Strip** etter lukking. Verifisering utføres best ved visuell inspeksjon fra siden.



Forsiktig:

Merk ikke den delen av lokkene som er rett over brønnene, da PCR-signalet leses ovenfra gjennom lokkene, og dette vil føre til feilaktige fluorescenssignaler.

Den store låsen øverst og nederst på hetten kan brukes til merking.

- Vortex alle lukkede **ScreenYu Gyn® Strips** i 3 sekunder på maksimal hastighet og sentrifuger dem av.

11.5.2 Utføre PCR- en på cobas z 480 Analyzer

Følgende avsnitt beskriver hvordan ScreenYu Gyn® utføres på Real-Time 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 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*.

- 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.
- Åpne programvaren og logg inn.
- Velg «Verktøy»  i handlingslinjen til høyre og opprett et nytt *Detection Format*. Gi det navnet *ScreenYu Gyn*. Velg filterkombinasjonen 465-510 og 540-610 (eksitasjon-emisjon). Lukk vinduet ved å klikke på *Close*-knappen.
- Velg *New Experiment* for å opprette en ny mal.
I fanen *Run Protocol* angir du *Detection Format* til *ScreenYu Gyn* og *Reaction Volume* til 20 µl. Programmer temperaturprotokollen i henhold til tabellen nedenfor.

PCR-temperaturprotokoll på cobas z 480 Analyzer

Programme 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
			61 °C	Single	00:00:30	2,2
Cooling	1 x	None	37 °C	None	00:01:00	2.2

- Lagre kjøremalen under navnet *ScreenYu Gyn* ved å velge *Apply Template* → *Save as Template* og lagre malen på ønsket sted.

11.5.2.2 Starte PCR-kjøringen

Hvis du lagret PCR-malen tidligere, kan du nå få tilgang til den ved å klikke på *New Experiment from Template* → *ScreenYu Gyn*. Kontroller at riktig temperaturprotokoll er angitt.

- Avhengig av plateoppsettet, velg en *Subset Template* i *Subset Editor*. For å gjøre dette, trykk på «+»-knappen, velg alle opptatte brønner i oppsettet og bekreft malen med *Apply*-knappen. Denne *Subset Template* kan lagres på ønsket sted via *Apply Template* → *Save as Template*.
- Velg et passende plateoppsett:

	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											

Eksempel på plateoppsett for 6 pasientprøver (1 – 6)

Analyse av en ufullstendig fylt plate utføres ved hjelp av en definert delmengde i *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	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip
H	6	14	22	30	38	46						

Eksempel på plateoppsett for 46 pasientprøver (1 – 46)

Analyse av en ufullstendig fylt plate utføres ved hjelp av en definert delmengde i *Subset Editor*.

Viktig: Plateoppsettet er ikke variabelt. Den positive kontrollen (PC) må plasseres i brønn A1 og den negative kontrollen (NTC) i brønn B1.

Tomme posisjoner skal fylles med tomme striper (Balance Strips) for å oppnå balanse, se kapittelet 7.

- Definer prøvermerkingen i *Sample Editor* ved å velge en definert delmengdemal i *trinn 2: Select Samples* → *Subset* og angi *Sample Name* i *trinn 3: Edit Properties*. Denne prøvemalen kan lagres på ønsket sted via *Apply Template* → *Save as Template*.
- Plasser stripene vertikalt i PCR-enheten i den definerte rekkefølgen.
Viktig: Bruk adapteren for PCR-striper (fra Roche Diagnostics GmbH).
- Lagre PCR-kjøringen under et unikt navn i ønsket mappe ved å trykke på «diskett»-knappen (på høyre side av handlingslinjen) og start PCR-kjøringen ved å klikke på knappen *Start Run* i fanen *Run Protocol (Experiment Editor)*.

11.5.2.3 Eksportere data

Hvis du analyserer PCR-kjøringen direkte på cobas z 480 Analyzer-datamaskinen, fortsett med 11.5.2.4 *Analyse av PCR-data*.

- Etter at PCR-analysen er fullført (*Run complete*), eksporterer du PCR-analysen via «» «Export» og lagrer filen på ønsket sted.

11.5.2.4 Analyse av PCR-data

Nedenfor beskrives analysen av de eksporterte dataene. Disse instruksjonene er laget ved hjelp av regnearkprogrammet Microsoft Excel. Det er også mulig å bruke andre egnede programmer.

- 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.
- Under *Analysis* velger du analysealgoritmen *Abs Quant/Fit Points* og den angitte delmengden, om nødvendig.
- I fanen *Cycle Range* angir du følgende parametre: *First Cycle* 1, *Last Cycle* 42 og *Background* til 5 til 20, ved å angi *Min Offset* til 4 og *Max Offset* til 19.
- I fanen *Noise Band* kontrollerer du at *STD Multiplier* er satt til 12 og at *Noise Band* beregnes automatisk.
- På grunn av påvisning av to forskjellige fluorescerende fargestoffer, utføres analysen av PCR-dataene separat for hver markør. Den respektive deteksjonskanalen velges via knappen *Filter Comb*:

Filterkombinasjoner og terskelinnstillinger på cobas z 480 Analyzer

Markør	Deteksjonskanal	Probe	Threshold
ACTB	465 – 510	FAM	1,2
ZNF671	540 – 610	ROX	0,5

- I fanen *Analysis* kontrollerer du at antall *Fit Points* er satt til 2.
- For **ACTB** velger du *Filter Comb* **465 - 510** og setter *Threshold* til **1,2**, og trykker på *Calculate*-knappen for å utføre analysen. Eksporter datatabellen som en .txt-fil ved å høyreklikke på *Export Table* under *Samples* og lagre den på et passende sted under et unikt navn.
- Velg deretter *Filter Comb* **540 - 610** for **ZNF671**, sett *Threshold* til **0,5** og trykk på *Calculate*-knappen for å utføre analysen. Eksporter datatabellen som en .txt-fil ved å høyreklikke på *Export Table* under *Samples* og lagre den på et passende sted under et unikt navn.

Forsiktig: Analyser alltid de to markørene etter hverandre som beskrevet, siden programmet alltid bruker manuelt angitte terskelverdier på alle filtre.

- Åpne et regnearkprogram som Microsoft Excel og kopier alle dataene fra begge .txt-filene, både for ZNF671-markøren (valgt filter: 540-610) og for ACTB-markøren (valgt filter: 465-510), inn i det.
- Formater dataene slik at resultatene fra de forskjellige prøvene vises under hverandre og ZNF671- og ACTB-markørene vises side om side.

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

Kontrollere gyldigheten av PCR-kjøringen

PCR-kjøringen er gyldig hvis den positive og negative kontrollen oppfyller følgende kriterier:

Gyldighetskriterier for ScreenYu Gyn®-kontrollene

Markør	Cp-verdi for positiv kontroll	Cp-verdi for negativ kontroll
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	ingen verdi
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	ingen verdi

Kontroll av prøvenes gyldighet

Resultatet av pasientprøven er gyldig hvis kontrollmarkøren ACTB oppfyller følgende kriterium:

Gyldighetskriterier for pasientprøven

Markør	Cp-verdi for pasientprøve
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Analyse av ScreenYu Gyn®-testen

Hvis metyleringsmarkøren ZNF671

- ikke gir en Cp-verdi, vil **ScreenYu Gyn®-resultatet** for denne prøven bli ansett som **negativt**.
- gir en Cp-verdi $> 0; < 20$, vil **ScreenYu Gyn®-resultatet** for denne prøven bli ansett som **ugyldig**.
- gir en Cp-verdi $\geq 20; \leq 42$, beregnes ΔCp i henhold til følgende ligning:

Beregning av ΔCp
$\Delta\text{Cp} = \text{Cp}_{\text{ZNF671}} - \text{Cp}_{\text{ACTB}}$

Hvis $\Delta C_p \leq 9,00$, vil ScreenYu Gyn®-resultatet for denne prøven bli ansett som **positivt**.

Hvis $\Delta C_p > 9,00$, vil ScreenYu Gyn®-resultatet for denne prøven bli ansett som **negativt**.

Et positivt ScreenYu Gyn®-resultat er assosiert med tilstedeværelse av cervikal intraepitelial neoplasia eller livmorhalskreft. ScreenYu Gyn® bør ikke betraktes som den endelige terapeutiske beslutningen og må analyseres i sammenheng med andre medisinske funn.

11.5.3 Utføre PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems

11.5.3.1 Opprettelse av PCR-mal fr

- Slå på PCR-enheten.
- Programmer PCR-temperaturprotokollen som beskrevet i tabellen nedenfor ved å velge og redigere temperaturtrinnene og tidene.

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*		61 °C	0:30
	4		GO TO Step 2	41 x
Cooling	5	1 x	30 °C	1:00

* Fluorescenssignalet registreres via «Plate Read» i step 3, 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.

- Sett reaksjonsvolumet til 20 µl og temperaturen på lokkvarmeren til 105 °C.
- Lagre PCR-malen med navnet *ScreenYu Gyn*.

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.

- Plasser **ScreenYu Gyn® Strips** i PCR-enheten ved å sette dem vertikalt inn i de små brønnene i varmeblokken. Velg et passende plateoppsett.

	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											

Eksempel på plateoppsett for 6 pasientprøver (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	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip
H	6	14	22	30	38	46						

Eksempel på plateoppsett for 46 pasientprøver (1–46)

Viktig: Platelayouten er ikke variabel. Den positive kontrollen (PC) må plasseres i brønn A1 og den negative kontrollen (NTC) i brønn B1.

Tomme posisjoner skal fylles med tomme striper (Balance Strips) for å oppnå balanse, se kapittelet 7.

- Gi kjøringen et passende filnavn. Merk at *All Channels* blir oppdaget før du starter kjøringen.

11.5.3.3 Eksportere dataene

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

11.5.3.4 Analysere PCR-dataene

Nedenfor beskrives analysen av de eksporterte dataene.

- Åpne BioRad CFX-programvaren på en datamaskin og sett først *Plate Type: BR White* under *User → User Preference → Plate* for å angi at det brukes hvit plast.
- Importer .pcrd-filen.
- Definer plateoppsettet under *Plate Setup → View/Edit Plate*. Klikk på *Select Fluorophores* for å velge de brukte fargestoffene FAM og ROX. De tilsvarende markørene ACTB (FAM) og ZNF671 (ROX) kan velges under *Target Names*. 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*.
- Angi analyseinnstillingene under *Settings*. Parametrene under *Baseline Threshold* må defineres separat for hvert fluorophor. For dette formålet må markørene i fanen *Quantification* velges bort eller velges.

Analyseinnstillinger på CFX96 Real-Time Detection System

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

- Velg alle prøver og eksporter dataene for begge markørene samtidig som en .xlsx-fil til en passende plassering under et unikt navn ved å høyreklikke på *Export to Excel*.
- Formater dataene slik at resultatene for de forskjellige prøvene vises under hverandre og ZNF671- og ACTB-markørene vises side om side.

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

Kontrollere gyldigheten av PCR-kjøringen

PCR-kjøringen er gyldig hvis de positive og negative kontrollene oppfyller følgende kriterier:

Gyldighetskriterier for ScreenYu Gyn®-kontrollene

Markør	Cq-verdi for positiv kontroll	Cq-verdi for negativ kontroll
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	ingen verdi
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	ingen verdi

Kontroll av prøvenes gyldighet

Resultatet av pasientprøven er gyldig hvis kontrollmarkøren ACTB oppfyller følgende kriterium:

Gyldighetskriterier for pasientprøven

Markør	Cq-verdi for pasientprøve
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Analyse av ScreenYu Gyn®-testen

Hvis metyleringsmarkøren ZNF671

- ikke gir en Cq-verdi, vil **ScreenYu Gyn®-resultatet** for denne prøven bli ansett **som negativt**.
- gir en Cq-verdi > 0 ; < 20 , vil **ScreenYu Gyn®-resultatet** for denne prøven bli ansett **som ugyldig**.
- gir en Cq-verdi ≥ 20 ; ≤ 42 , beregnes ΔCq i henhold til følgende ligning:

Beregning av ΔCq

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

Hvis $\Delta Cq \leq 10,00$, vil **ScreenYu Gyn®-resultatet** for denne prøven bli ansett som **positivt**.

Hvis $\Delta Cq > 10,00$, vil **ScreenYu Gyn®-resultatet** for denne prøven bli ansett som **negativt**.

Et positivt ScreenYu Gyn®-resultat er assosiert med tilstedeværelse av cervikal intraepitelial neoplasi eller livmorhalskreft. ScreenYu Gyn® bør ikke betraktes som den endelige terapeutiske beslutningen og må analyseres i sammenheng med andre medisinske funn.

12 SCREENYU GYN® YTELSE

Ytelsesdataene for CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System vises. I tilfelle avvik i dataene fra cobas z 480 Analyzer, er disse oppført separat. Hvis dataene fra cobas z 480 Analyzer ikke er eksplisitt vist, samsvarer de med dataene som vises for CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

12.1 Analytisk ytelse

12.1.1 Analytisk følsomhet

Den analytiske følsomheten til PCR-analysen ble bestemt ved hjelp av metylert bisulfittkonvertert genomisk humant DNA. De respektive deteksjonsgrensene er oppført i tabellen nedenfor. Fortynningsseriene ble testet i 9-fold bestemmelse. I gjennomsnitt brukes 120–180 ng DNA i analysen for ett utstryk.

Analytisk følsomhet – Del 1

Brukt DNA	Omtrentlig antall celler i analysen*	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
0,2 ng	30 celler	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 celler	9 / 9	9 / 9
0,05 ng	7,5 celler	9 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 celler	9 / 9	9 / 9
0,01 ng	1,5 celler	9 / 9	7 / 9
0,005 ng	< 1 celle	5 / 9	3 / 9

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

Deteksjonsgrensen for de to markørene på CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System er totalt 3 celler (0,02 ng) i den totale prøven.

På cobas z 480 Analyzer er deteksjonsgrensen for de to markørene totalt 7,5 celler (0,05 ng) i den totale prøven.

Kvantifiseringsgrensene for ScreenYu Gyn®-analysen tilsvarer deteksjonsgrensene, noe som gir en linearitet på $R^2 = 0,99$ for begge markørene innenfor kvantifiseringsgrensene.

I tillegg ble en DNA-blanding av metylert bisulfittkonvertert genomisk humant DNA og umetylert genomisk humant DNA testet. I hvert tilfelle ble det brukt 20 ng DNA eller 100 ng DNA per analyse. Fortynningsseriene ble testet i triplikat eller i 9-fold bestemmelse.

Analytisk følsomhet – Del 2

Andel metylert DNA	Totalt DNA	ScreenYu Gyn® positiv
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

Deteksjonsgrensen for et positivt resultat av markøren ZNF671 er 0,1 % metylert DNA for en prøve som inneholder totalt 20 ng DNA eller 100 ng DNA per analyse.

12.1.2 Analytisk spesifisitet – påvisning av umetylert DNA

Den analytiske spesifisiteten til PCR-analysen ble bestemt ved hjelp av umetylert PCR-fragmenter på 10–12 kb som representerer det menneskelige genomet. Det ble utført en 5-foldig bestemmelse. Resultatene er vist i tabellen nedenfor. Prøvene ble klassifisert som gyldige via ACTB-markøren. Opp til en konsentrasjon på 1000 ng umetylert, bisulfittkonvertert DNA (biDNA) ble det ikke oppnådd falskt positive ScreenYu Gyn®-resultater.

Analytisk spesifisitet av PCR-analysen

Brukt DNA	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
100 ng umetylerte biDNA	0 / 5	5 / 5
250 ng umetylerte biDNA	0 / 5	5 / 5
500 ng umetylerte biDNA	0 / 5	5 / 5
1000 ng umetylerte biDNA	0 / 5	5 / 5
1000 ng genomisk DNA	0 / 5	0 / 5

12.2 Presisjon

12.2.1 Repeterbarhet

To bisulfittkonverterte pasientprøver ble testet i ti uavhengige kjøringar med ScreenYu Gyn®-analysen (4 replikater hver). I alle 40 bestemmelsene hadde Pap I-prøven et negativt ScreenYu Gyn®-resultat, og CIN3 hadde et positivt ScreenYu Gyn®-resultat. Prøvene viser dermed 100 % repeterbarhet.

12.2.2 Reproduserbarhet

Ved fem sentre ble 20 pasientprøver testet med ScreenYu Gyn®. Hver gang ble det utført en ny prøvepreparering og bisulfittbehandling av forskjellige personer, ved hjelp av forskjellige qPCR-enheter (cobas z 480 Analyzer, LightCycler® 480 I, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System). 18 av 20 pasientprøver var konsistente. Dette gir en reproduksjonsevne på 90 %.

12.3 Riktighet

Riktigheten til ScreenYu Gyn®-analysen ble verifisert via Sanger-sekvensering ved bruk av 15 pasientprøver. Negativt testede pasientprøver viste ingen metylerte cytosiner i den respektive genomiske regionen. Positivt testede pasientprøver viste den korrekte ZNF671-genomiske regionen med en høy grad av metylering i sekvensen.

12.4 Nøyaktighet

Nøyaktighet er angitt som summen av presisjon og riktighet for ScreenYu Gyn®-analysen.

12.5 Robusthet

Det ble ikke observert noen forstyrrelser i utstrykprøver tilsatt SiHa-celler når økte konsentrasjoner av følgende stoffer ble tilsatt prøven:

- opptil 0,5 % Lugols løsning
- opptil 0,5 % eddiksyre

12.6 Cut-off-verdi (Grenseverdi)

Den optimale cut-off for analysen ble bestemt ved hjelp av den såkalte Youdens indeks. Følgende kriterier må være oppfylt for et positivt ScreenYu Gyn®-resultat:

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

$\Delta Cq_{ZNF671-CTB} \leq 10 \rightarrow$ ScreenYu Gyn®-resultatet er positivt

$\Delta Cq_{ZNF671-CTB} > 10 \rightarrow$ ScreenYu Gyn®-resultatet er negativt

Cobas z 480 Analyzer

$\Delta Cp_{ZNF671-CTB} \leq 9 \rightarrow$ ScreenYu Gyn®-resultatet er positivt

$\Delta Cp_{ZNF671-CTB} > 9 \rightarrow$ ScreenYu Gyn®-resultatet er negativt

12.7 Klinisk ytelsesevaluering

Pasientprøvene som ble brukt her, ble hentet fra europeiske klinikker (Tyskland, Portugal).

Bisulfittbehandling av pasientprøver med EZ DNA Methylation-Lightning Kit ble utført med en sentrifugeringshastighet på 18 000 xg og en desulfoneringstid på 20 minutter.

For den kliniske ytelsesevalueringen av ScreenYu Gyn® ble 616 pasientprøver undersøkt med følgende prevalensfordeling av funn: Pap I (n = 380; 61,7 %), CIN 1 (n = 47; 7,6 %), CIN 2 (n = 50; 8,1 %), CIN 3 (n = 132; 21,4 %), livmorhalskreft (n = 7; 1,1 %). Andelen ugyldige prøver var 1,3 % (n = 8).

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

Klinisk ytelsesevaluering av ScreenYu Gyn®

Funnet i henhold til cytologi/histologi	Deteksjon	KI 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 %

Kliniske ytelsesdata CIN 3+ / Pap I	Verdi	KI 95 %
Sensitivitet	64,75 %	56,2 % - 72,7 %
Spesifisitet	90,67 %	87,3 % - 93,4 %
Positiv prediktiv verdi	72,00 %	63,3 % - 79,7 %
Negativ prediktiv verdi	87,40 %	83,7 % - 90,5 %
Positiv sannsynlighetsratio	6,96	-
Negativ sannsynlighetsratio	0,39	-

KI = konfidensintervall

13 BEGRENSNINGER VED PROSEDYREN

- Tolkning av ScreenYu Gyn®-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 følges 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 for humant papillomavirus-DNA-positivitet. *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. *Klinisk epigenetikk.* 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

ScreenYu Gyn® Kit må kun brukes i samsvar med det tiltenkte formålet. 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

Hvis du har spørsmål om eller problemer med produktet, kan du kontakte din Epitype GmbH-representant.

Du kan nå Epitype GmbHs tekniske support mandag til fredag mellom kl. 08.00 og 16.00 på følgende telefonnummer: +49 (0) 3641 5548500

Utenfor kontortiden kan du sende oss en e-post til: support@epitype.de

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

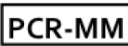
01109 Dresden, Deutschland (Tyskland)

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

17 YTTERLIGERE MERKNADER

- Regulatorisk merknad til kunder i Den europeiske union: Vær oppmerksom på at du er forpliktet til å rapportere 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)
	Kapsler		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
8 (2025-09)	Korrektur av oversettelsesfeil: - Korreksjon av kapitteloverskrifter • 12.3 Nøyaktighet → Riktighet • 12.4 Presisjon → Nøyaktighet • 12.6 Grenseverdi → Cut-off-verdi (Grenseverdi) - Korreksjon av setninger i kapittel 12.3: • Riktigheten til ScreenYu Gyn®-analysen ble verifisert via Sanger-sekvensering ved bruk av 15 pasientprøver. - Korreksjon av setninger i kapittel 12.4: • Nøyaktighet er angitt som summen av presisjon og riktighet for ScreenYu Gyn®-analysen. Optimalisering av bunnteksten i kortprotokollen, versjon av IFU refereres til

20 KORT PROTOKOLL

Nedenfor finner du en mal for en hurtigveiledning i form av en sjekkliste.

Før du bruker hurtigstartguiden, må du lese bruksanvisningen som er beskrevet i detalj i kapittelet 11, inkludert alle merknader.

Bisulfitt-settet er ikke inkludert i ScreenYu Gyn® Kit. Bisulfittbehandling av prøver må utføres ved hjelp av EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD) (se kapittelet 7 for referanseinformasjon).

Forberedelse av prøver

- ☐ Vortex pasientprøver i 5 sekunder ved maksimal hastighet og overfør 1 ml til 1,5 ml reaksjonsrør
- ☐ Sentrifuger prøvene i 5 minutter ved 10 000 xg
- ☐ Fjern og kast 900 µl av supernatanten over pellet

Bisulfittbehandling av prøver

- ☐ Forbered EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) i henhold til produsentens instruksjoner
- ☐ Resuspender pellet
- ☐ Sett opp reaksjonen i et 0,5 ml reaksjonsrør, vortex og sentrifuger

Reaksjon for bisulfittkonvertering

Komponent	Per reaksjon
Lightning Conversion Reagent	130 µl
Resuspendert prøve	20 µl
Totalt volum	150 µl

- ☐ Utfør bisulfittbehandlingen i henhold til produsentens instruksjoner for EZ DNA Methylation-Lightning Kit og følg de tilleggstrinnene:
- ☐ Kast gjennomstrømningen etter det siste vasketrinnet
- ☐ Sentrifuger kolonnen i det tomme Collection-Tube i 1 minutt på full hastighet for å tørke den helt
- ☐ Overfør kolonnen til et 1,5 ml reaksjonsrør
- ☐ Pipetter 15 µl M-Elution Buffer på kolonnen og sentrifuger ved 8000 xg i 30 sekunder

Forberedelse og pipettering av PCR

- ☐ Sentrifuger prøven
- ☐ Vortex og sentrifuger ScreenYu Gyn® Mastermix
- ☐ Fjern PCR-lokkene fra ScreenYu Gyn® Strips og kast dem
- ☐ Pipetter 10 µl ScreenYu Gyn® Mastermix per brønn
- ☐ Pipetter 10 µl prøve eller ScreenYu Gyn® Positive Control (i brønn A1) eller ScreenYu Gyn® Water (i brønn B1)
- ☐ Lukk ScreenYu Gyn® Strips med ubrukte ScreenYu Gyn® Caps (gjennomsiktig pose)
- ☐ Vortex og sentrifuger ScreenYu Gyn® Strips

Utfør PCR

- ☐ Slå på realtids-PCR-enheten, åpne programvaren om nødvendig og velg *ScreenYu Gyn Template*
- ☐ Gi PCR-kjøringen et navn, rediger plateoppsettet, sjekk temperaturprotokollen

PCR-temperaturprotokoll

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

- ☐ Plasser ScreenYu Gyn® Strips og Balance Strips i enheten og start PCR-kjøringen

Analyse og tolkning av PCR-data

- ☐ Åpne den eksporterte filen og slå sammen dataene i et egnet regnearkprogram
- ☐ Formater dataene slik at resultatene fra de forskjellige prøvene vises under hverandre og ZNF671- og ACTB-markørene vises side om side
- ☐ Kontroller resultatene av positiv kontroll og negativ kontroll for begge markørene
- ☐ Analyser resultatet for de innsamlede prøvene

En prøve anses som positiv i ScreenYu Gyn®-analysen når følgende kriterier er oppfylt:

Gyldighets- og positivitetskriterier

PCR-apparat	Markør	Ct-verdi	$\Delta Ct_{ZNF671 - ACTB}$
cobas z 480 Analyzer	ACTB	$\geq 20, \leq 32$	-
	ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 9,00$
CFX96 Real-Time PCR Detection Systems	ACTB	$\geq 20, \leq 32$	-
	ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 10,00$

Et positivt ScreenYu Gyn®-resultat er forbundet med tilstedeværelse av cervikal intraepitelial neoplasia eller livmorhalskreft. ScreenYu Gyn® bør ikke betraktes som den endelige terapeutiske avgjørelsen og må analyseres sammen med andre medisinske funn.