



ScreenYu Gyn®

Basic UDI-DI: 426076785SCREENYUGYNP6

Instruções de utilização



SG001-46



Até 46 amostras

UDI-DI

4260767852212

Por favor, leia atentamente estas instruções de utilização antes de utilizar o teste e siga-as com cuidado para garantir a confiança dos resultados do teste.

ScreenYu Gyn® é um kit de diagnóstico *in vitro* para a detecção qualitativa de um marcador epigenético em ADN bissulfito-convertido de amostras cervicais de mulheres com um resultado no teste HPV ou um resultado pouco claro no teste Papanicolaou que ainda precisa de ser clarificado. Um resultado positivo no teste ScreenYu Gyn® correlaciona-se com a presença de uma neoplasia intraepitelial cervical ou de um carcinoma cervical.

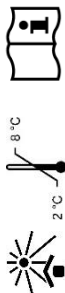
Para ser usado para Diagnóstico *In Vitro* (IVD) exclusivamente por pessoal treinado.



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



Revisão 9 (2026-02)
Tradução publicada em 2026-02



ARMAZENE IMEDIATAMENTE APÓS A RECEÇÃO

O ScreenYu Gyn® Kit é enviado à temperatura ambiente e é usada uma marca para medição da temperatura para monitorizar se o intervalo de validade da temperatura foi excedido. Imediatamente após a receção, verifique a marca para medição da temperatura que está colada ao kit e verifique se a cor mudou. Verifique também a embalagem secundária, o selo e a embalagem primária e confirme que não estão danificados. O kit deve ser refrigerado imediatamente após a receção, a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, e protegido da luz. Se transportado e armazenado corretamente, o ScreenYu Gyn® Kit e os seus componentes podem ser usados até à data indicada.



Monitorização da temperatura de transporte

A marca para medição da temperatura colada ao ScreenYu Gyn® Kit monitoriza a temperatura durante o transporte. Uma marca prateada clara indica que o kit foi entregue em conformidade com a temperatura de transporte. Uma marca preta evidencia não-conformidade com a temperatura de transporte específica, o que significa que os parâmetros de desempenho do ScreenYu Gyn® Kit já não podem ser garantidos. Neste caso por favor contate Epitype GmbH.

ÍNDICE

1	Finalidade prevista	4
2	Significado clínico	4
3	Princípio do teste	4
4	Design do ensaio ScreenYu Gyn®	5
4.1	ScreenYu Gyn® Strips	5
4.2	Controlos	5
4.2.1	Controlo de qualidade ao tratamento com bissulfito (marcador de controlo ACTB).....	5
4.2.2	Controlo positivo.....	6
4.2.3	Controlo negativo	6
5	Material de referência	6
6	Conteúdo do kit	6
7	Consumíveis e equipamento (não incluídos no kit)	7
8	Armazenamento e tempo de vida em prateleira	8
9	Instruções de segurança.....	8
9.1	Informações gerais.....	8
9.2	Divisão espacial.....	9
9.3	Prevenção da contaminação	9
9.4	Instruções para o manuseamento	9
10	Eliminação	10
11	Procedimento ScreenYu Gyn®	11

11.1	Fluxo de trabalho	11
11.2	Amostragem.....	11
11.3	Preparação das amostras	12
11.4	Tratamento das amostras com bissulfito	12
11.5	PCR.....	13
11.5.1	Preparação e pipetagem da PCR	13
11.5.2	Realização da PCR com o cobas z 480 Analyzer	14
11.5.3	Realização da PCR com o CFX96 Real-Time PCR Detection System	19
12	Desempenho de ScreenYu Gyn®	23
12.1	Desempenho analítico	23
12.1.1	Sensibilidade analítica.....	23
12.1.2	Especificidade analítica – detecção de ADN não metilado	24
12.2	Precisão	25
12.2.1	Repetibilidade.....	25
12.2.2	Reprodutibilidade	25
12.3	Veracidade	25
12.4	Exatidão.....	25
12.5	Robustez.....	25
12.6	Limiar de resposta (cut-off).....	25
12.7	Avaliação do desempenho clínico	26
13	Limitações do procedimento	27
14	Referências	27
15	Responsabilidade	27
16	Questões e problemas	28
17	Notas adicionais.....	28
18	Significado dos símbolos.....	28
19	Lista de alterações	29
20	Protocolo resumido.....	29

1 FINALIDADE PREVISTA

ScreenYu Gyn® é um kit de diagnóstico *in vitro* para a detecção qualitativa de um marcador epigenético em ADN bissulfito-convertido de amostras cervicais de mulheres com um resultado positivo no teste HPV ou um resultado pouco claro no teste Papanicolau que ainda precisa de ser clarificação. Um resultado positivo no teste ScreenYu Gyn® correlaciona-se com a presença de uma neoplasia intraepitelial cervical ou de um carcinoma cervical.

ScreenYu Gyn® está apenas indicado para a utilização por pessoal de laboratório qualificado e familiarizado com técnicas de biologia molecular. A interpretação dos resultados deve sempre ser feita em conjunção com resultados de outros procedimentos laboratoriais de diagnóstico, bem como ter em consideração o contexto clínico.

2 SIGNIFICADO CLÍNICO

O cancro do colo do útero é o quarto mais comum caso de cancro nas mulheres a nível mundial, com > 600.000 novos casos diagnosticados por ano [1]. Em quase todos os casos, uma infeção persistente com o papilomavirus humano (HPV) carcinogénico é a causa subjacente [2] e um pré-requisito para o desenvolvimento de cancro do colo do útero. As mulheres negativas para o HPV possuem um risco extremamente baixo de desenvolverem cancro do colo do útero, e mesmo a maioria das mulheres com infeção por HPV não desenvolvem um estágio pré-cancerígeno. Apenas cerca de 15% das mulheres infetadas com HPV desenvolvem um estágio pré-cancerígeno ou carcinoma que requer tratamento [3].

Às pacientes testadas positivamente para o HPV e/ou com resultado do Teste de Papanicolau aguardando clarificação (Pap II, Pap III e Pap IIID1 e D2) é então realizada a realização de um teste de triagem como o ScreenYu Gyn®, para determinar com elevada exatidão a probabilidade da presença de cancro ou o seu precursor.

ScreenYu Gyn® não deve ser considerado como a decisão terapêutica final e deve ser avaliado em conjunção com outras observações médicas.

3 PRINCÍPIO DO TESTE

ScreenYu Gyn® baseia-se na detecção de um biomarcador epigenético, isto é, na metilação de uma secção específica do ADN, cuja presença corresponde à presença de lesão pré-cancerígena ou carcinoma cervical [4, 5, 6]. Adicionalmente é analisado um marcador de referência bissulfito-específico. As regiões do marcador usadas são mostradas na tabela abaixo.

Vista geral das regiões do marcador

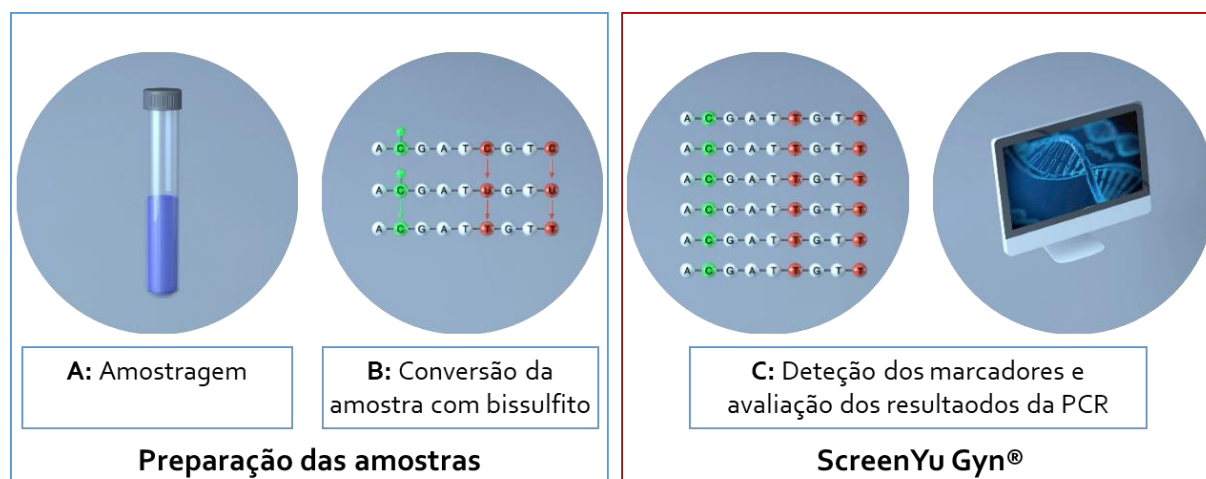
Designação no protocolo	Região do marcador (designação do gene)	Marcador fluorescente
Marcador de metilação	ZNF671	ROX
Marcador de controlo	ACTB	FAM

A detecção é realizada usando Real-Time PCR baseada em sondas de elevada sensibilidade. O output dos instrumentos de Real-Time é o Valor Cp (Cross point, cobas z 480 Analyzer) ou valor Cq (Cycle quantification, CFX96 Real-Time PCR Detection System), ambos correspondendo ao limite do ciclo valor Ct e são também referidos abaixo como tal. Este valor corresponde ao ciclo, numa Real-Time PCR, em que a fluorescência aumenta pela primeira vez acima de um determinado valor-limite.

A análise de uma amostra de paciente usando ScreenYu Gyn® envolve duas etapas.

Em primeiro lugar, o ADN do esfregaço de colo do útero é convertido pelo bissulfito e a metilação é fixada. Na segunda etapa o ADN tratado com bissulfito e eluído é analisado por Real-Time PCR baseada em sonda específica para a metilação. A seção do ADN metilado originalmente é amplificada seletivamente usando os primers das ScreenYu Gyn® Strips. A detecção da metilação e do marcador de controlo são realizadas usando sondas marcadas com corantes fluorescentes. Adicionalmente, são incluídos um controlo positivo e um negativo para confirmar a PCR. Subsequentemente realiza-se a análise específica para o ensaio.

A amostragem e o kit de bissulfito não fazem parte do ScreenYu Gyn® Kit. Produtos desenhados especificamente para amostragem e tratamento com bissulfito estão disponíveis separadamente.



Princípio do teste

A: O ginecologista colhe um esfregaço do cérvix da paciente usando um kit de amostragem adequado.

B: O laboratório de diagnóstico realiza o tratamento com bissulfito da amostra da paciente.

C: Uma reação PCR duplex é realizada por amostra. A análise é realizada através da detecção de sondas marcadas com corante contidas na ScreenYu Gyn® Strip.

4 DESIGN DO ENSAIO SCREENYU GYN®

4.1 ScreenYu Gyn® Strips

O ensaio ScreenYu Gyn® é baseado em sondas TaqMan. Cada ScreenYu Gyn® Strip é uma tira de PCR com 8 poços contendo dois pares de primer em cada poço, bem como uma sonda associada para amplificação do marcador de metilação específico ZNF671 e do marcador de controlo ACTB. Um poço de uma ScreenYu Gyn® Strip é necessário para a análise de uma amostra de paciente.

4.2 Controlos

O desenho do ScreenYu Gyn® Kit inclui três controlos para monitorizar a qualidade da amostra e do tratamento com bissulfito (marcador ACTB) bem como a qualidade da reação de PCR (controlo positivo e controlo negativo).

4.2.1 Controlo de qualidade ao tratamento com bissulfito (marcador de controlo ACTB)

Este marcador de controlo verifica o sucesso da conversão de todas as citosinas não metiladas a uracilos e assim a qualidade do tratamento com bissulfito realizado. A detecção é realizada por amplificação de um fragmento de ADN próximo do gene humano para a beta-Actina (ACTB). Se não existe amplificação de ACTB com um valor Ct abaixo de 32, o ensaio da amostra é considerado inválido e tem de ser repetido.

4.2.2 Controlo positivo

O controlo positivo monitoriza a qualidade da PCR. A amplificação do ScreenYu Gyn® Positive Control (PC) deve fornecer um valor Ct abaixo de 38 tanto para o marcador de metilação como para o marcador controlo. Caso contrário, a PCR é inválida e tem de ser repetida.

4.2.3 Controlo negativo

O controlo negativo é uma reação de controlo com ScreenYu Gyn® Water (NTC – No Template Control) como molde, pelo que tem de ser negativo para ambos os marcadores. Se ocorrem valores Ct no controlo negativo, é provável que tenha havido contaminação e o ensaio ScreenYu Gyn® tem de ser repetido.

5 MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não está disponível material de referência internacional.

6 CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo do ScreenYu Gyn® Kit

Designação dos componentes	Símbolo	Conteúdo	Volume/Quantidade SGo01-46
ScreenYu Gyn® Mastermix	PCR-MM	PCR Mastermix ¹ (2x)	1 x 0.55 ml
ScreenYu Gyn® Strips	STRIPS	PCR strip ²	6 Tiras
ScreenYu Gyn® Caps	CAPS	Tampas para tiras	6 Tampas
ScreenYu Gyn® Positive Control	CONTROL+	Controlo positivo	1 x 90 µl
ScreenYu Gyn® Water	H₂O	Água	1 x 2 ml
Instruções de utilização	-	Instruções de utilização	1

¹ Contém todos os componentes necessários para a Polymerase chain reaction (PCR), exceto os primers, as sondas e o template.

² Contém os primers e sondas necessários para a PCR.

7 CONSUMÍVEIS E EQUIPAMENTO (NÃO INCLUÍDOS NO KIT)

ScreenYu Gyn® só pode ser usado em combinação com os consumíveis e equipamentos listados e somente por pessoal qualificado. Todo o material laboratorial necessário deve ser instalado, calibrado, manuseado e mantido de acordo com as instruções do fabricante.

Temperatura ambiente definida como entre 15 °C e 30 °C.

Equipamento necessário

Equipamento	Catalogue no.	Fornecedor
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® ou Cervex-Brush® Combi	-	Rovers Medical Devices

* Para ser usado como tiras de equilíbrio em PCR, consulte o layout da placa na página 15 ou na página 19.

O equipamento de laboratório e os consumíveis listados em seguida são necessários para realizar o ensaio ScreenYu Gyn®.

- Centrífuga para tubos de reação de 0,5 ml/1,5 ml, $\geq 10,000 \times g$
- Centrífuga para tiras de PCR
- Termociclador para tubos de reação de 0,5 ml
- Vortex / agitador
- Pipetas com gamas de volume diferentes e associadas a pontas com filtro (estéreis, DNase-free)
- Suporte para tubos de reação 0,5 ml/1,5/2 ml
- Suporte de 96 poços para tiras de PCR
- Tubos de reação para 0,5 ml/1,5 ml (DNase-free)
- Etanol 96 – 100%, não desnaturado
- Aparelho Real-time PCR, canais de detecção para FAM e ROX

ScreenYu Gyn® foi validado nos aparelhos de real-time PCR seguintes:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) com bloco de 96 poços, adaptador para tiras de PCR e LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0 (Service Pack 3), avaliação com versão 1.5.1.62
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) com CFX Maestro software versão 2.3

8 ARMAZENAMENTO E TEMPO DE VIDA EM PRATELEIRA

Se transportado e armazenado convenientemente, o ScreenYu Gyn® Kit e os seus componentes podem ser usados até à data indicada. Todos os reagentes contidos no kit são estáveis até à data de validade após abertura indicada, se forem armazenados sob as condições indicadas e protegidos da contaminação.

Temperatura de armazenamento do ScreenYu Gyn® Kit e equipamento não incluído no kit

Equipamento	Temperatura de armazenamento
ScreenYu Gyn® Kit	2 °C a 8 °C
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE IVD)	15 °C a 30 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C a 30 °C
Cervex-Brush® ou Cervex-Brush® Combi	15 °C a 30 °C

9 INSTRUÇÕES DE SEGURANÇA

9.1 Informações gerais

Durante o estabelecimento dos métodos modernos de biologia molecular, as instruções seguintes devem ser seguidas rigorosamente de forma a garantir a máxima segurança para o pessoal do laboratório e para obter resultados de elevada qualidade:

- Como há o envolvimento de processos de biologia molecular, tais como o tratamento com bissulfito, a amplificação e a deteção de ADN, este kit destina-se apenas ao diagnóstico *in vitro* e só deve ser usado por pessoal treinado na prática laboratorial para o diagnóstico *in vitro*.
- Antes de usar o produto, leia as instruções atentamente. Só deve considerar a versão mais recente.
- Use em cada etapa uma bata adequada, luvas descartáveis e, se necessário, óculos de proteção.
- Evite o contato direto com as amostras biológicas, bem como respingar ou pulverizar as amostras.
- A tampa aquecida e o bloco de aquecimento do termociclador podem atingir temperaturas até aos 110 °C. Existe o risco de queimaduras. Por favor, tenha atenção às instruções operacionais do aparelho.
- Lave as mãos abundantemente após manuseamento de amostras e reagentes.
- Não utilize ScreenYu Gyn® se a embalagem dos reagentes estiver danificada. Contate o seu distribuidor.
- Não use o ScreenYu Gyn® Kit após a data de validade e não use reagentes expirados.
- Não misture reagentes de lotes diferentes e não misture reagentes com reagentes de outros fabricantes.
- Use apenas os materiais fornecidos com o kit ou recomendados pelo fabricante.
- Todo o equipamento de laboratório necessário deve ser instalado, calibrado, manuseado e mantido de acordo com as instruções do fabricante.
- Pipetar pequenos volumes de líquido na gama dos microlitros requer prática. Certifique-se de que pipeta os volumes necessários com as micropipetas da forma mais precisa possível.

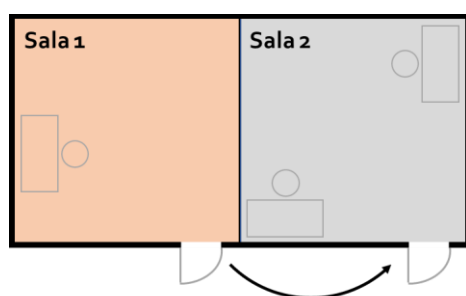
- Tem de haver conformidade com os requisitos legais aplicáveis para o operador.
- Pressupõe-se a adesão às Boas Práticas de Laboratório (BPL) conforme delineado, por exemplo, pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) ou pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Especificamente, devem considerar-se as recomendações para a realização de testes de amplificação molecular.
- O funcionamento adequado dos aparelhos de PCR só é garantido à temperatura ambiente.

9.2 Divisão espacial

Devido à elevada sensibilidade analítica da PCR, deve prestar-se especial atenção à manutenção da pureza dos componentes do kit e amostras.

A PCR multiplica secções da amostra de ADN milhões a biliões de vezes. Até as quantidades mais pequenas destes produtos de PCR (ex. também espalhadas como aerossol) podem originar resultados falsos, se forem transpostas para o mesmo material de amostra, para os reagentes, para o tratamento com bissulfito ou para os reagentes de PCR deste kit.

Um fluxo de trabalho limpo e bem estruturado é então crucial para prevenir resultados incorretos. Para este fim, é necessário separar as áreas do laboratório para pré-PCR e pós-PCR uma da outra. Equipamentos, consumíveis, batas e luvas independentes devem estar disponíveis em cada área. Nunca transfira batas, luvas ou equipamento de uma área para a outra. A figura abaixo mostra um exemplo de um laboratório dividido em duas salas independentes. Uma área está designada apenas ao tratamento com bissulfito e à preparação da PCR, enquanto na outra área se realiza a PCR.



Divisão espacial

O tratamento das amostras com bissulfito bem como a preparação completa da PCR são realizados na sala 1 (o uso de uma câmara de PCR seria ótimo). Na sala 2 realiza-se a PCR, a deteção e a análise.

9.3 Prevenção da contaminação

- Batas e luvas têm de ser usadas durante todas as etapas.
- As luvas descartáveis devem ser trocadas frequentemente e sempre após (suspeita de) contaminação com reagentes ou material de amostra.
- Todas as superfícies, equipamento e materiais devem ser descontaminados com uma solução de limpeza adequada (agentes destruidores de ADN).
- Não toque no interior dos tubos de reação nem nas suas tampas.
- Tem de usar-se sempre pontas com filtro adequadas para pipetar (sem DNase, RNase nem ADN humano) para excluir contaminação cruzada via aerossóis gerados durante a pipetagem. As pontas devem ser sempre mudadas entre etapas de pipetagem.
- É importante realizar controlos negativos para detetar possível contaminação.

9.4 Instruções para o manuseamento

- Armazene os componentes não usados na embalagem original até os usar.
- Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente.

- O fluxo de trabalho pode ser interrompido depois do tratamento com bissulfito. Neste ponto, as amostras podem ser armazenadas até uma semana entre 2 °C e 8 °C ou até dois meses a –15 °C a –30 °C.
- As ScreenYu Gyn® Strips e ScreenYu Gyn® Caps não devem ser tocadas sem luvas descartáveis durante todo o procedimento, caso contrário podem surgir sinais de fluorescência não específica.
- As ScreenYu Gyn® Strips e ScreenYu Gyn® Caps estão destinadas a utilização única e não devem ser reutilizadas.
- Guarde as ScreenYu Gyn® Strips e ScreenYu Gyn® Caps na sua embalagem original. É imperativo que guarde as ScreenYu Gyn® Strips afastadas da luz.

10 ELIMINAÇÃO

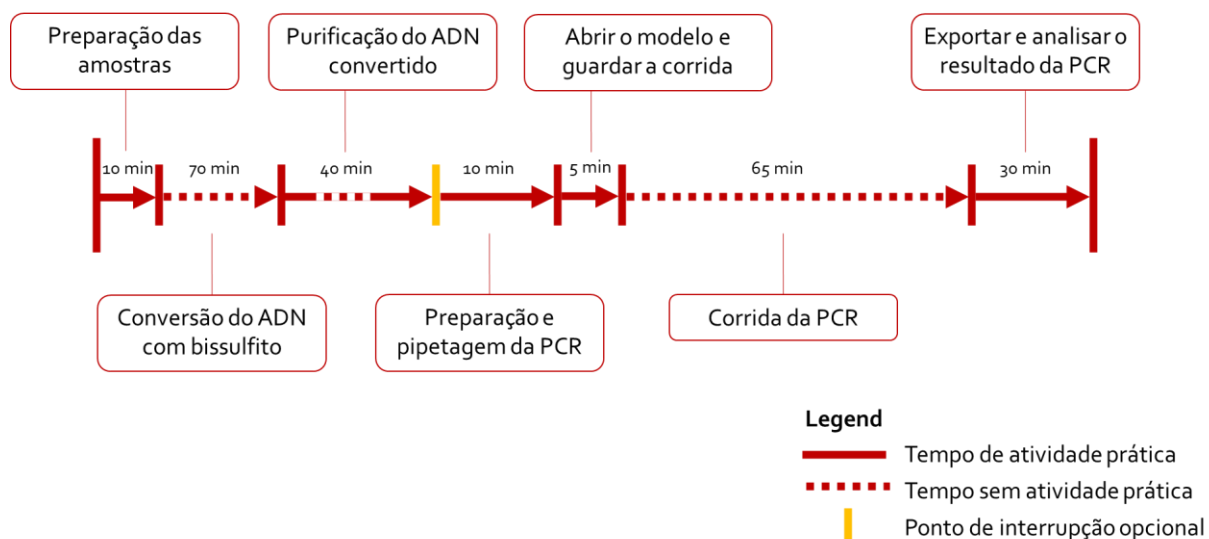
O ScreenYu Gyn® Kit e os seus componentes podem ser eliminados sem precauções especiais. Amostras de pacientes e tubos de reação usados devem ser tratados como material infeccioso. Todos os reagentes têm de ser eliminados de acordo com a regulamentação legal.

11 PROCEDIMENTO SCREENYU GYN®

O capítulo seguinte contém a descrição detalhada das diferentes etapas desde a amostragem até à análise dos dados.

11.1 Fluxo de trabalho

No conjunto, ScreenYu Gyn® pode ser processado em menos de 4 horas. O tempo de manuseamento ativo é de aproximadamente 2 horas. Durante o procedimento ScreenYu Gyn® inicial, deve contar com 15 minutos para a criação de um modelo de PCR.



Cronograma do fluxo de trabalho ScreenYu Gyn®

11.2 Amostragem

O kit de amostragem não faz parte do ScreenYu Gyn® Kit. Frascos de ThinPrep® PreservCyt® (Hologic, Inc.) e aparelhos de amostragem Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) estão disponíveis através do contato com os respetivos fabricantes. A colheita de uma amostra cervical pelo médico deve ser realizada de acordo com as instruções do fabricante e em conformidade com as orientações aceites geralmente para a colheita de uma amostra de esfregaço do colo do útero [7].

Importante: A cabeça da escova do aparelho de recolha da amostra não deve ficar no contentor da amostra após a colheita, caso contrário vai afetar o desempenho de ScreenYu Gyn®.

A ThinPrep® PreservCyt® Solution deve ser usada como o meio do esfregaço. O uso de outros meios de amostragem não fez parte da validação do ensaio ScreenYu Gyn®.

Garantir a boa qualidade do ADN empregue na amostra é um pré-requisito importante para a validade do ensaio. Amostragem, tratamento com bissulfito e armazenagem de ADN inadequados podem levar a resultados falsos negativos.

As amostras cervicais podem ser transportadas até ao laboratório de teste sem refrigeração. As amostras podem ser guardadas até 1,5 anos a uma temperatura de 2 °C a 30 °C.

11.3 Preparação das amostras

As etapas seguintes devem ser conduzidas na área de preparação da amostra (Sala 1).

Importante: Se a cabeça da escova da zaragatoa de colheita estiver no frasco de amostragem, tem de ser primeiro removida e eliminada.

- Vortex todas as amostras de pacientes durante 5 seg. à velocidade máxima e transfira imediatamente 1 ml do meio para um tubo de reação de 1,5 ml.

Atenção: As células vão estabelecer-se no fundo do frasco muito rapidamente. Não devem passar mais de 10 segundos entre misturar a amostra de paciente e retirar a amostra de 1 ml!

- Centrifugue as amostras durante **5 minutos a 10.000 xg**.
- Com cuidado, remova 900 µl do sobrenadante acima do pellet sem destruir o pellet.

Atenção: Dependendo da natureza da amostra, o pellet pode ser mais ou menos sólido.

- Ressuspenda o pellet vortexando durante 2 segundos. Adicione 20 µl da amostra ressuspensa para o tratamento com bissulfito. Elimine os restantes 80 µl.

11.4 Tratamento das amostras com bissulfito

O kit de bissulfito não está incluído no ScreenYu Gyn® Kit. ScreenYu Gyn® foi validado usando o EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH).

- **Entrada:** Adicione **20 µl da amostra ressuspensa + 130 µl de Lightning Conversion Reagent** num tubo de reação de 0,5 ml.
- Realize o tratamento com bissulfito de acordo com as instruções do fabricante do EZ DNA Methylation-Lightning Kit, com as seguintes modificações:

- Descarte o fluxo após a última etapa de lavagem.
- Centrifugue a coluna um Collection Tube vazio durante **1 minuto à velocidade máxima** para secá-la completamente.

Atenção: Não pule esta etapa, pois resíduos de etanol podem comprometer o desempenho do ensaio ScreenYu Gyn®.

- Elua em **15 µl de M-Elution Buffer** durante **30 segundos a 8.000 xg**.

11.5 PCR

Antes de iniciar a PCR, garanta que o protocolo de temperaturas da PCR está programado no aparelho Real-Time PCR, de forma a minimizar o tempo entre a preparação e o início da PCR. Para estabelecer o programa da PCR no cobas z 480 Analyzer, prossiga como descrito na página 14. A explicação para PCR no CFX96 Real-Time PCR Detection System pode ser encontrada a partir da página 19.

11.5.1 Preparação e pipetagem da PCR

Importante: A preparação e a pipetagem das reações de PCR não deve demorar mais de 60 minutos. Esta etapa decorre na Sala 1 (área pré-PCR).

Por favor, note o esquema de placas descrito nas páginas 15 ou 19, respetivamente. O controlo positivo (PC) tem de estar posicionado no poço A1 e o controlo negativo (NTC) no poço B1.

- Retire a **ScreenYu Gyn® Mastermix** e o número de **ScreenYu Gyn® Strips** necessárias do kit e coloque-as num suporte para 96 poços.

Atenção: Uma **ScreenYu Gyn® Strip** é suficiente para oito ensaios PCR. Por favor note que um controlo positivo e negativo (água, NTC) têm de ser executados em cada corrida de PCR.

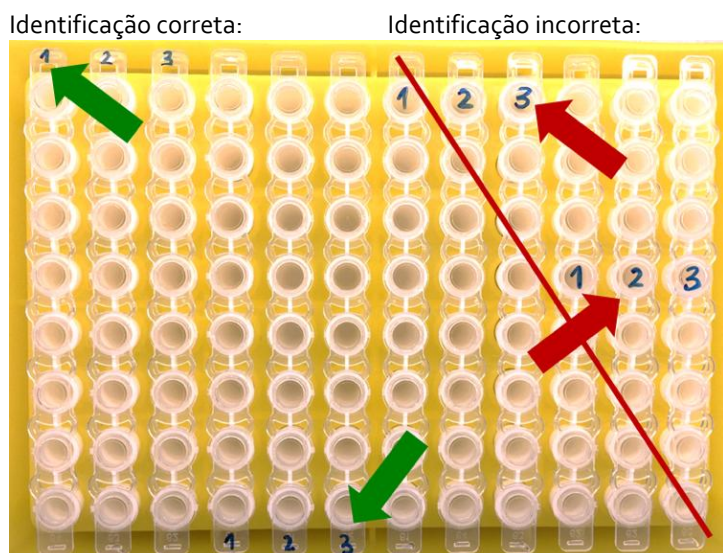
- Vortexe a **ScreenYu Gyn® Mastermix** durante 3 segundos à velocidade máxima e centrifugue o líquido para fora.
- Retire a **tampas de PCR** das **ScreenYu Gyn® Strips** e **elimine-as**.
- Adicione **10 µl** da **ScreenYu Gyn® Mastermix** a cada poço da **ScreenYu Gyn® Strip**.
- Vortexe o eluato da amostra durante 3 segundos à velocidade máxima e centrifugue brevemente.
- Adicione **10 µl da amostra** ao poço contendo **ScreenYu Gyn® Mastermix**.

Importante: Mude de ponta de pipeta entre cada etapa de pipetagem.

Nota: Mantenha o restante dos eluatos da amostra para uma repetição da PCR do **ScreenYu Gyn®**, se necessário.

- Vortexe **ScreenYu Gyn® Positive Control** durante 3 segundos à velocidade máxima e centrifugue o líquido para fora.
- Adicione **10 µl** de **ScreenYu Gyn® Positive Control** ao poço A1 e **10 µl de ScreenYu Gyn® Water** ao poço B1 como controlo negativo.
- Feche cada **ScreenYu Gyn® Strip** com uma **ScreenYu Gyn® Cap** não utilizada (saco transparente).

Atenção: Não toque no interior das **ScreenYu Gyn® Strips** e **ScreenYu Gyn® Caps**. Certifique-se que a **ScreenYu Gyn® Cap** está assente corretamente na **ScreenYu Gyn® Strip** após o fecho. A verificação é mais fácil por inspeção visual pela lateral.



Atenção:

Não identifique a parte das tampas que está diretamente acima dos poços, pois o sinal de PCR é lido através das tampas e pode levar a sinais de fluorescência incorretos.

Pode usar as abas largas no topo e na base das tampas para identificação.

- Vortexe todas as **ScreenYu Gyn® Strips** fechadas durante 3 segundos à velocidade máxima e centrifugue o líquido para fora.

11.5.2 Realização da PCR com o cobas z 480 Analyzer

A secção seguinte delineia como realizar o ScreenYu Gyn® no sistema Real-Time PCR cobas z 480 Analyzer (marcado a azul) e no CFX96 Real-Time PCR Detection System (marcado a verde). Contudo, siga sempre as instruções do fabricante para a utilização de aparelhos de PCR.

A PCR deve ser realizada na Sala 2.

11.5.2.1 Criação de um modelo de PCR

Se criou e gravou o modelo de PCR anteriormente, pode prosseguir para 11.5.2.2 *Inicialização da corrida de PCR*.

- Ligue o cobas z 480 Analyzer e o seu computador. No limite de 15 segundos, selecione "User defined Workflow" no ecrã do computador na BIOS para mudar para um modo de programação livre do aparelho.
- Abra o software e registe-se.
- Selecione "Tools"  na barra de ação à direita e crie um novo *Detection Format*. Nomeie-o ScreenYu Gyn. Selecione a combinação de filtros 465 - 510 e 540 - 610 (Excitação-Emissão). Feche a janela clicando no botão *Close*.
- Selecione *New Experiment* para criar um novo modelo.
No separador *Run Protocol*, defina o *Detection Format* para *ScreenYu Gyn* e defina o *Reaction Volume* para 20 µl. Programe o protocolo de temperaturas de acordo com a tabela abaixo.

Protocolo de temperaturas de PCR para o cobas z 480 Analyzer

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

- Guarde o modelo de corrida com o nome ScreenYu Gyn selecionando *Apply Template* → *Save as Template* e guardando o modelo na localização desejada.

11.5.2.2 Inicialização da corrida de PCR

Se guardou o modelo de PCR anteriormente, pode agora aceder a ele clicando em *New Experiment from Template* → *ScreenYu Gyn*. Verifique que está definido o protocolo de temperaturas correto.

- Dependendo do esquema de placa, selecione um *Subset Template* em *Subset Editor*. Para fazer isto, pressione o botão "+", selecione todos os poços ocupados no esquema e confirme o modelo com o botão *Apply*. Este *Subset Template* pode ser guardado na localização desejada através de *Apply Template* → *Save as Template*.
- Selecione um esquema de placa adequado:

	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	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip
H	6											

Exemplo de um esquema de placa para 6 amostras de pacientes (1 – 6)

Análise de uma placa preenchida de forma incompleta é realizada através de um subset definido em *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						

Exemplo de um esquema de placa para 46 amostras de pacientes (1 – 46)

Análise de uma placa preenchida de forma incompleta é realizada através de um subset definido em *Subset Editor*.

Importante: O esquema da placa não é variável. O controlo positivo (PC) tem de estar posicionado no poço A1 e o controlo negativo (NTC) no poço B1.

As posições vazias devem ser preenchidas com tiras vazias (Balance Strips) para balanceamento, conforme indicado no capítulo 7.

- Defina a identificação das amostras em *Sample Editor* selecionando um modelo de subset definido em *Step 2: Select Samples → Subset* e inserindo *Sample Name* em *Step 3: Edit Properties*. Este modelo de amostra pode ser guardado na localização desejada através de *Apply Template → Save as Template*.

- Coloque as tiras verticalmente no aparelho de PCR na ordem indicada.

Importante: Utilize o adaptador para tiras PCR (Roche Diagnostics GmbH).

- Guarde a corrida de PCR com um nome único na pasta desejada pressionando o botão "floppy disk" (à direita na barra de ação) e inicie a corrida de PCR clicando no botão *Start Run* no separador *Run Protocol (Experiment Editor)*.

11.5.2.3 Exportação dos dados

Se estiver a analisar a série de PCR diretamente no computador do cobas z 480 Analyzer, por favor siga para 11.5.2.4 *Análise dos dados da PCR*.

- Depois de completar a série da PCR (*Run complete*), exporte a corrida de PCR via  "Export" e guarde o ficheiro na localização desejada.

11.5.2.4 Análise dos dados da PCR

Seguidamente descreve-se a análise dos dados exportados. Estas instruções foram criadas usando o programa de folha de cálculo Microsoft Excel. Também é possível utilizar outros programas adequados.

- Se exportou a corrida de PCR, inicie o software LightCycler® 480 noutro computador e/ou importe a corrida de PCR. Caso contrário, efetue a análise no computador do cobas z 480 Analyzer.
- Em *Analysis*, selecione o algoritmo de análise *Abs Quant/Fit Points* e o subset especificado, se necessário.
- No separador *Cycle Range*, defina os seguintes parâmetros: *First Cycle* 1, *Last Cycle* 42 e *Background* para 5 a 20, definindo *Min Offset* como 4 e *Max Offset* como 19.
- No separador *Noise Band*, verifique que *STD Multiplier* está definido para 12 e *Noise Band* é calculado automaticamente.
- Devido à deteção de dois corantes fluorescentes diferentes, a análise dos dados de PCR é realizada separadamente para cada marcador. O canal de deteção respetivo é selecionado pelo botão *Filter Comb*:

Combinação de filtros e definições de valor-limite para o cobas z 480 Analyzer

Marcador	Canal de deteção	Sonda	Threshold
ACTB	465 – 510	FAM	1,2
ZNF671	540 – 610	ROX	0,5

- No separador *Analysis*, verifique que o número de *Fit Points* está definido para 2.
- Selecione, para **ACTB**, o *Filter Comb* 465 - 510 e defina o *Threshold* como **1,2** e pressione o botão *Calculate* para realizar a análise. Exporte a tabela de dados como ficheiro .txt clicando no botão direito do rato em *Export Table* em *Samples* e guarde numa localização adequada com um nome único.
- Em seguida, para **ZNF671**, selecione o *Filter Comb* 540 - 610 e defina o *Threshold* para **ZNF671** como **0,5** e pressione o botão *Calculate* para realizar a análise. Exporte a tabela de dados

como ficheiro .txt clicando no botão direito do rato em *Export Table* em *Samples* e guarde numa localização adequada com um nome único.

Atenção: Analise sempre os dois marcadores um a seguir ao outro conforme descrito, pois o programa aplica sempre a todos os filtros valores-limite definidos manualmente.

- Abra um programa de folha de cálculo como Microsoft Excel e copie para o seu interior todos os dados de ambos os ficheiros .txt, ambos para o marcador ZNF671 (Selected Filter: 540-610) e para o marcador ACTB (Selected Filter: 465-510).
- Formate os dados de forma a que os resultados das amostras diferentes são apresentados abaixo uns dos outros e os marcadores ZNF671 e ACTB são apresentados lado a lado.

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

Verificação da validade da corrida de PCR

A corrida de PCR é válida se os controlos positivo e negativo corresponderem aos seguintes critérios:

Critérios de validade para os controlos ScreenYu Gyn®

Marcador	Valor Cp para controlo positivo	Valor Cp para controlo negativo
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	nenhum valor
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	nenhum valor

Verificação da validade das amostras

O resultado de uma amostra de paciente é válido se o marcador ACTB corresponder ao seguinte critério:

Critério de validade para a amostra de paciente

Marcador	Valor Cp para amostra de paciente
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Análise do Ensaio ScreenYu Gyn®

Se o marcador de metilação ZNF671

- Não obtiver um valor Cp, o **resultado ScreenYu Gyn®** para esta amostra é considerado **negativo**.
- Resultar num valor Cp $> 0; < 20$, o **resultado ScreenYu Gyn®** para esta amostra é considerado **inválido**.

- Resultar num valor $Cp \geq 20$; ≤ 42 , a ΔCp é calculada de acordo com a equação seguinte:

Cálculo de ΔCp

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

Se $\Delta Cp \leq 9.00$, o resultado ScreenYu Gyn® para esta amostra é considerado **positivo**.

Se $\Delta Cp > 9.00$, o resultado ScreenYu Gyn® para esta amostra é considerado **negativo**.

Um resultado ScreenYu Gyn® positivo está associado com a presença de neoplasia cervical intraepitelial ou carcinoma cervical. ScreenYu Gyn® não deve ser considerado como a decisão terapêutica final e deve ser analisado em conjugação com outras observações médicas.

11.5.3 Realização da PCR com o CFX96 Real-Time PCR Detection System

11.5.3.1 Criação de um modelo de PCR

- Ligue o aparelho de PCR.
- Programe o protocolo de temperaturas de PCR conforme descrito na tabela abaixo selecionando e editando as etapas de temperatura e tempos.

*Protocolo de temperaturas de PCR** no CFX96 Real-Time PCR Detection System*

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 Etapa 2	41 x
Cooling	5	1 x	30 °C	1:00

* O sinal de fluorescência é detetado via "Plate Read" durante a Etapa 3, o que é simbolizado pelo símbolo de uma câmara.

** No CFX96 Real-Time PCR Detection System, a ramp é, por defeito, 5 °C/seg. Esta definição foi usada para validar este teste IVD.

- Defina o volume de reação para 20 µl e a temperatura do aquecedor da tampa para 105 °C.
- Guarde o modelo de PCR usando o nome *ScreenYu Gyn*.

11.5.3.2 Inicialização da corrida de PCR

Se guardou o modelo de PCR anteriormente, pode agora aceder a ele. Verifique que está definido o protocolo de temperaturas correto.

- Coloque as **ScreenYu Gyn® Strips** no aparelho de PCR inserindo-as verticalmente nos poços pequenos do bloco de aquecimento. Selecione um esquema de placa adequado.

	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											

Exemplo de esquema de placa para 6 amostras de pacientes (1 - 6)

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

Exemplo de esquema de placa para 46 amostras de pacientes (1 - 46)

Importante: O esquema de placa não é variável. O controlo positivo (PC) tem de ser colocado no poço A1 e o controlo negativo (NTC) no poço B1.

As posições vazias devem ser preenchidas com tiras vazias (Balance Strips) para balanceamento, conforme indicado no capítulo 7.

- Nomeie a corrida usando um nome de ficheiro apropriado. Verifique que está selecionado *All Channels* antes de iniciar a corrida.

11.5.3.3 Exportação dos dados

- Após completar a PCR, exporte a corrida de PCR (ficheiro .pcrd).

11.5.3.4 Análise dos dados de PCR

Seguidamente descreve-se a análise dos dados exportados.

- Num computador, abra BioRad CFX Software e defina primeiro *Plate Type: BR White* em *User* → *User Preferences* → *Plate* para indicar que plástico branco é usado.
- Importe o ficheiro .pcrd.
- Defina o esquema de placa em *Plate Setup* → *View/Edit Plate*. Clique no botão *Select Fluorophores* para selecionar os corantes usados FAM e ROX. Pode selecionar os marcadores correspondentes ACTB (FAM) e ZNF671 (ROX) em *Target Names*. Insira o nome em *Sample Names*.
- As posições desocupadas são marcadas e podem ser excluídas da análise selecionando *Exclude Wells in Analysis*.
- Confirme o esquema de placa com *OK*.
- Defina as definições de análise em *Settings*. Os parâmetros em *Baseline Threshold* têm de ser definidos separadamente para cada fluoróforo. Para este fim, os marcadores podem ser desselecionados ou selecionados no separador *Quantification*.

Definições de análise com o CFX96 Real-Time Detection System

Parameter	Settings
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

- Selecione todas as amostras e exporte os dados para ambos os marcadores ao mesmo tempo para um ficheiro .xlsx numa localização apropriada sob um nome único clicando com o botão direito do rato em *Export to Excel*.
- Formate os dados de modo a que os resultados das amostras diferentes sejam apresentados uns abaixo dos outros e os marcadores ZNF671 e ACTB sejam apresentados lado a lado.

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

Verificação da validade da corrida de PCR

A corrida de PCR é válida se os controlos positivo e negativo corresponderem aos seguintes critérios:

CrITÉRIOS de validade para os controlos ScreenYu Gyn®

Marcador	Valor Cq para controlo positivo	Valor Cq para controlo negativo
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	nenhum valor
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	nenhum valor

Verificação da validade das amostras

O resultado de uma amostra de paciente é válido se o marcador ACTB corresponder ao seguinte critério:

CrITÉRIO de validade para a amostra de paciente

Marcador	Valor Cq para amostra de paciente
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Análise do Ensaio ScreenYu Gyn®

Se o marcador de metilação ZNF671

- Não obtiver um valor Cq, o **resultado ScreenYu Gyn®** para esta amostra é considerado **negativo**.
- Resultar num valor Cq > 0; < 20, o **resultado ScreenYu Gyn®** para esta amostra é considerado **inválido**.
- Resultar num valor Cq ≥ 20; ≤ 42, a ΔCp é calculada de acordo com a equação seguinte:

Cálculo de ΔCq

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

Se $\Delta Cq \leq 10.00$, o **resultado ScreenYu Gyn®** para esta amostra é considerado **positivo**.

Se $\Delta Cq > 10.00$, o **resultado ScreenYu Gyn®** para esta amostra é considerado **negativo**.

Um resultado ScreenYu Gyn® positivo está associado com a presença de neoplasia cervical intraepitelial ou carcinoma cervical. ScreenYu Gyn® não deve ser considerado como a decisão terapêutica final e deve ser analisado em conjunção com outras observações médicas.

12 DESEMPENHO DE SCREENYU GYN®

Apresentam-se os dados de desempenho do CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. No caso de desvios dos dados obtidos com o cobas z 480 Analyzer, estes aparecem listados separadamente. Se os dados do cobas z 480 Analyzer não forem apresentados explicitamente, então correspondem aos dados apresentados para o CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

12.1 Desempenho analítico

12.1.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do ensaio de PCR foi determinada usando amostras de ADN genómico humano metilado e bissulfito-convertido. Os limites de deteção correspondentes estão resumidos na tabela seguinte. As séries de diluição foram testadas numa determinação de fator 9. Em média, 120 – 180 ng de ADN de um esfregaço foram usados por ensaio.

Sensibilidade Analítica – Parte 1

ADN usado	Número aproximado de células no ensaio *	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
0,2 ng	30 células	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 células	9 / 9	9 / 9
0,05 ng	7,5 células	9 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 células	9 / 9	9 / 9
0,01 ng	1,5 células	9 / 9	7 / 9
0,005 ng	< 1 célula	5 / 9	3 / 9

* Uma célula cont+em aprox. 6 – 7 pg ADN genómico

O limite de deteção geral para os dois marcadores no CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System é um total de 3 células (0,02 ng) de amostra total.

No cobas z 480 Analyzer o limite de deteção para os dois marcadores é um total de 7,5 células (0,05 ng) de amostra total.

Os limites de quantificação do ensaio ScreenYu Gyn® correspondem aos limites de deteção, resultando numa linearidade com $R^2 = 0.99$ para ambos os marcadores dentro dos limites de quantificação.

Adicionalmente, testou-se uma mistura de ADN genómico humano metilado bissulfito-convertido e ADN genómico humano não metilado. Em cada caso, usaram-se 20 ng ADN ou 100 ng ADN por ensaio. As séries de diluição foram testadas em triplicado numa determinação de fator 9.

Sensibilidade Analítica – Parte 2

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

O limite de deteção para o resultado positivo para o marcador ZNF671 é de 0,1 % ADN metilado para uma amostra contendo um total de 20 ng ADN ou 100 ng ADN por ensaio.

12.1.2 Especificidade analítica – deteção de ADN não metilado

A especificidade analítica do ensaio de PCR foi determinada usando fragmentos de PCR não metilados de 10 – 12 kb representando o genoma humano. Realizou-se uma determinação de fator 5. Os resultados estão apresentados na tabela abaixo. As amostras foram classificadas como válidas através do marcador ACTB. Até uma concentração de 1.000 ng de ADN não metilado bissulfito convertido (biADN) não se obteve nenhum resultado ScreenYu Gyn® falso positivo.

Especificidade analítica do ensaio de PCR

ADN usado	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
100 ng biADN não metilado	0 / 5	5 / 5
250 ng biADN não metilado	0 / 5	5 / 5
500 ng biADN não metilado	0 / 5	5 / 5
1.000 ng biADN não metilado	0 / 5	5 / 5
1.000 ng ADN genómico	0 / 5	0 / 5

12.2 Precisão

12.2.1 Repetibilidade

Duas amostras de pacientes bissulfito-convertidas foram testadas em dez corridas independentes com o ensaio ScreenYu Gyn® (4 réplicas cada). Em cada uma das 40 determinações, a amostra Pap I teve um resultado ScreenYu Gyn® negativo e a amostra CIN3 teve um resultado ScreenYu Gyn® positivo. Logo, as amostras demonstram 100% repetibilidade.

12.2.2 Reprodutibilidade

Em cinco centros, 20 amostras de pacientes foram testadas com ScreenYu Gyn®. Em cada caso realizaram-se uma nova preparação da amostra e tratamento com bissulfito por pessoas diferentes, usando aparelhos de qPCR diferentes (cobas z 480 Analyzer, LightCycler® 480 I, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System). 18 de 20 amostras de pacientes mostraram ser consistentes. Isto representa uma reprodutibilidade de 90%.

12.3 Veracidade

A veracidade do ensaio ScreenYu Gyn® foi verificada por sequenciação Sanger utilizando 15 amostras de pacientes. As amostras de pacientes testadas negativamente não apresentavam citosinas metiladas na região genômica respetiva. As amostras de pacientes testadas positivamente mostraram a região genômica correta de ZNF671 com um elevado grau de metilação dentro da sequência.

12.4 Exatidão

Apresenta-se a exatidão como a soma da precisão e da veracidade do ensaio ScreenYu Gyn®.

12.5 Robustez

Nenhuma interferência foi observada em amostras de esfregaço fortificadas com células SiHa quando se concentrações incrementais das seguintes substâncias foram adicionadas à amostra:

- até 0,5 % solução de Lugol
- até 0,5 % ácido acético

12.6 Limiar de resposta (cut-off)

O limiar de resposta ótimo foi determinada usando o chamado Youden's Index. Os critérios seguintes têm de ser verificados para um resultado ScreenYu Gyn® positivo:

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

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

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

Cobas z 480 Analyzer

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

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

12.7 Avaliação do desempenho clínico

As amostras de pacientes usadas foram obtidas de clínicas europeias (Alemanha, Portugal).

O tratamento com bissulfito das amostras de pacientes com o EZ DNA Methylation-Lightning Kit foi realizado com uma velocidade de centrifugação de 18.000 xg e um tempo de dessulfonação de 20 minutos.

Para a avaliação do desempenho clínico de ScreenYu Gyn®, 616 amostras de pacientes foram observadas com a seguinte distribuição da prevalência de observações: Pap I (n = 380; 61,7 %), CIN 1 (n = 47; 7,6 %), CIN 2 (n = 50; 8,1 %), CIN 3 (n = 132; 21,4 %), carcinoma cervical (n = 7; 1,1 %). A taxa de amostras inválidas foi de 1,3 % (n = 8).

Baseado da linha de corte estabelecida, calcularam-se a sensibilidade e a especificidade.

Avaliação do desempenho clínico de ScreenYu Gyn®

Observações de acordo com a citologia/histologia	Deteção	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 %

Dados de desempenho clínico CIN 3+ / Pap I	Valor	CI 95 %
Sensibilidade	64,75 %	56,2 % - 72,7 %
Especificidade	90,67 %	87,3 % - 93,4 %
Valor preditivo positivo	72,00 %	63,3 % - 79,7 %
Valor preditivo negativo	87,40 %	83,7 % - 90,5 %
Razão de verossimilhança positiva	6,96	-
Razão de verossimilhança negativa	0,39	-

CI = intervalo de confiança

13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- A interpretação dos resultados ScreenYu Gyn® deve ser sempre efetuada em conjunto com outros procedimentos laboratoriais de diagnóstico, bem como considerando o panorama clínico.
- Tem de aderir-se às especificações de acordo com as instruções, como p.ex., volumes de pipetagem, tempos de incubação, temperaturas e etapas de preparação para evitar resultados erróneos.
- Amostragem e armazenamento adequados são críticos para os resultados do teste.
- Por princípio, não se pode excluir de um procedimento de teste de biologia molecular sequências variantes muito raras que possam influenciar o resultado do teste, e que ainda não tenham sido cobertas pelas fontes consultadas para a análise de especificidade e sensibilidade de primers e sondas.
- O desempenho instrumental não-específico, bem como desvios ao procedimento do teste, às condições especificadas de armazenamento, materiais, equipamento ou material de amostragem recomendado poderão resultar em resultados diferentes de quando todas as especificações são cumpridas.
- Os controlos internos e externos fornecidos são auxiliares para a deteção de falhas. No entanto, não podem detetar todas as falhas possíveis. É da responsabilidade do utilizador validar quaisquer modificações feitas ou, se necessário, os equipamentos usados e garantir conformidade com as especificações do aparelho.

14 REFERÊNCIAS

- [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 RESPONSABILIDADE

O ScreenYu Gyn® Kit só pode ser usado de acordo a finalidade prevista. Epitype GmbH não assume responsabilidade para qualquer outro uso (i.e., não conformidade com as instruções de utilização e uso indevido) e qualquer dano resultante.

16 QUESTÕES E PROBLEMAS

No caso de questões ou problemas com o produto, por favor contate o seu representante na Epitype GmbH.

Pode contactar o apoio técnico da Epitype GmbH de segunda a sexta entre as 8h e as 16h, através do número: +49 (0) 3641 5548500

Fora do horário de expediente, envie e-mail para: support@epitype.de

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

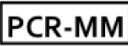
01109 Dresden, Deutschland (Alemanha)

Diretores executivos: Dr. Alfred Hansel, Dra. Martina Schmitz, Dr. Timm Zörgiebel

17 NOTAS ADICIONAIS

- Aviso regulamentar aos clientes da União Europeia: por favor observe a sua obrigação de reportar às entidades competentes e à Epitype GmbH quaisquer incidentes graves que tenham ocorrido em relação ao produto.
- A versão atual da ficha de dados de segurança está disponível em Download Centre no website (<https://www.epitype.de/downloadcenter/>) ou pode ser solicitada por e-mail para support@epitype.de.

18 SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
	Mastermix		Temperatura de armazenamento
	Tiras de PCR		Se fechado, pode ser usado até (AAAA-MM-DD)
	Tampas		Conteúdo suficiente para <n> testes
	Controlo positivo		Fabricante
	Água		Consulte as instruções de utilização
	Diagnóstico <i>in vitro</i>		Proteger da radiação solar
	Designação do lote		Não reutilizar
	Número de referência		Marca CE

19 LISTA DE ALTERAÇÕES

Versão anterior (Data de publicação)	Alterações
8 (2025-09)	Correção de erros de tradução: - Correção dos títulos dos capítulos • 12.3 Exatidão → Veracidade • 12.4 Precisão → Exatidão • 12.6 Linha de corte → Limiar de resposta (cut-off) - Correção das frases no capítulo 12.3: • A veracidade do ensaio SreenYu Gyn® foi verificada por sequenciação Sanger utilizando 15 amostras de pacientes. - Correção das frases no capítulo 12.4: • Apresenta-se a exatidão como a soma da precisão e da veracidade do ensaio ScreenYu Gyn®. - Correção das frases no capítulo 12.6: • O limiar de resposta ótimo foi determinada usando o chamado Youden's Index. Otimização do rodapé no protocolo resumido, referência à versão das instruções de utilização

20 PROTOCOLO RESUMIDO

Abaixo encontrará um modelo para um guia rápido sob a forma de checklist.

Antes de usar o Protocolo Resumido, leia atentamente as instruções de utilização descritas em detalhe no Capítulo 11, incluindo todas as notas.

O kit de bissulfito não está incluído no ScreenYu Gyn® Kit. O tratamento das amostras com bissulfito deve ser realizado usando EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD) (ver Capítulo 7 para informação de referência).

Preparação das amostras

- ☐ Agite as amostras de pacientes durante 5 segundos à velocidade máxima e transfira 1 ml para um tubo de reação de 1,5 ml
- ☐ Centrifugue as amostras durante 5 minutos a 10.000 xg
- ☐ Retire e elimine 900 µl do sobrenadante acima do pellet

Tratamento das amostras com bissulfito

- ☐ Prepare o EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) de acordo com as instruções do fabricante
- ☐ Resuspenda o pellet
- ☐ Prepare a reação num tubo de reação de 0,5 ml, agite e centrifugue

Reação para a conversão com bissulfito

Componente	Por reação
Lightning Conversion Reagent	130 µl
Amostra ressuspendida	20 µl
Volume total	150 µl

- ☐ Realize o tratamento com bissulfito conforme as instruções do fabricante do EZ DNA Methylation-Lightning Kit e siga os passos adicionais:
- ☐ Descarte o eluato após a última etapa de lavagem
- ☐ Centrifugue a coluna no Collection Tube vazio durante 1 minuto à velocidade máxima para secá-la completamente
- ☐ Transfira a coluna para um tubo de reação de 1,5 ml
- ☐ Pipete 15 µl de M-Elution Buffer para a coluna e centrifugue a 8.000 xg durante 30 segundos

Preparação e pipetagem da PCR

- ☐ Centrifugue a amostra
- ☐ Agite e centrifugue a ScreenYu Gyn® Mastermix
- ☐ Retire as tampas de PCR das ScreenYu Gyn® Strips e elimine-as
- ☐ Pipete 10 µl de ScreenYu Gyn® Mastermix por poço
- ☐ Pipete 10 µl da amostra, de ScreenYu Gyn® Positive Control (para o poço A1) ou de ScreenYu Gyn® Water (para o poço B1)
- ☐ Feche cada ScreenYu Gyn® Strip com uma ScreenYu Gyn® Caps não utilizada (saco transparente)
- ☐ Agite e centrifugue as ScreenYu Gyn® Strips

Realização da PCR

- ☐ Ligue o aparelho de PCR, abra o software se necessário e selecione o modelo ScreenYu Gyn
- ☐ Nomeie cada corrida de PCR individualmente, edite o esquema de placa, verifique o protocolo de temperaturas

Protocolo de temperaturas de PCR

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

- ☐ Coloque as ScreenYu Gyn® Strips no aparelho e inicie a corrida de PCR

Análise e interpretação dos dados da PCR

- ☐ Abra o ficheiro exportado e funda os dados num programa de folha de cálculo apropriado
- ☐ Formate os dados de modo a que os resultados de amostras diferentes sejam apresentados uns abaixo dos outros e os marcadores ZNF671 e ACTB sejam apresentados lado a lado
- ☐ Verifique os resultados dos controlos positivo e negativo para ambos os marcadores
- ☐ Analise os resultados das amostras colhidas

Uma amostra é considerada positivo para o ensaio ScreenYu Gyn® se cumprir com os seguintes critérios:

Crítérios de validade e positividade

Equipamento de PCR	Marcador	Valor 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	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 10,00$

Um resultado ScreenYu Gyn® positivo está associado à presença de neoplasia cervical intraepitelial ou carcinoma cervical. ScreenYu Gyn® não deve ser considerado como a decisão terapêutica final e deve ser analisado em conjugação com outras observações médicas.