



ScreenYu Gyn®

Grundläggande UDI-DI: 426076785SCREENYUGYNP6

Bruksanvisning



SG001-46



Upp till 46 prover

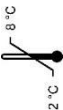
UDI-DI

4260767852212

Läs dessa användningsinstruktioner noggrant innan du använder testet och följ dem noggrant för att säkerställa resultatens tillförlitlighet.



ScreenYu Gyn® är ett in vitro-diagnostiskt kit för kvalitativ detektion av en human epigenetisk markör i bisulfitbehandlat DNA från cervixprover från kvinnor med ett positivt HPV-test eller med ett avvikande cellprov som kräver vidare utredning. Ett positivt resultat med ScreenYu Gyn® är associerat med förekomst av cervikal intraepitelial neoplasia eller livmoderhalscancer.



Får endast användas för in vitro-diagnostik (IVD) av utbildad personal.

Revisions 9 (2026-02)

Översättning publicerad 2026-02



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



FÖRVARA OMEDELBART EFTER LEVERANS

ScreenYu Gyn® Kit levereras vid rumstemperatur och temperaturmätningmärket används för att kontrollera om det validerade temperaturintervallet överskrids. Kontrollera omedelbart efter mottagandet temperaturmätningmärket som är fäst på kitet och kontrollera om färgen har förändrats. Kontrollera även ytterförpackningen, förseglingen och primärförpackningen och bekräfta att de inte är skadade. Kitet måste kylförvaras omedelbart efter mottagandet vid en temperatur mellan 2 °C och 8 °C och skyddas från ljus. Om ScreenYu Gyn® Kit och dess komponenter transporteras och förvaras på rätt sätt kan de användas fram till det angivna datumet.



Övervakning av transporttemperaturen

Temperaturmätmärket som är fäst på ScreenYu Gyn® Kit övervakar temperaturen under transporten. Ett ljusgrått märke indikerar att kitet har levererats i enlighet med transporttemperaturen. Ett svart märke visar att den angivna transporttemperaturen inte har följts, vilket innebär att prestandaparametrarna för ScreenYu Gyn® Kit inte längre kan garanteras. Kontakta i så fall Epitype GmbH.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1	Avsett ändamål	4
2	Klinisk betydelse	4
3	Testprincip	4
4	ScreenYu Gyn®-testets utformning	5
4.1	ScreenYu Gyn® Strips	5
4.2	Kontroller	5
4.2.1	Kvalitetskontroll av bisulfitbehandling (kontrollmarkör ACTB)	5
4.2.2	Positiv kontroll	5
4.2.3	Negativ kontroll	6
5	Referensmaterial	6
6	Kitets innehåll	6
7	Förbrukningsmaterial och utrustning (ingår inte i kitet)	7
8	Förvaring och hållbarhet	8
9	Säkerhetsanvisningar	8
9.1	Allmän information	8
9.2	Rummets utformning	9
9.3	Undvika kontaminering	9
9.4	Hanteringsanvisningar	9
10	Avfallshantering	10
11	ScreenYu Gyn®-procedur	11

11.1	Arbetsflöde	11
11.2	Provtagning	11
11.3	Provberedning	12
11.4	Bisulfitbehandling av prover	12
11.5	PCR.....	13
11.5.1	Förberedelse och pipettering av PCR	13
11.5.2	Utförande av PCR-reaktionen på cobas z 480 Analyzer.....	14
11.5.3	Utförande av PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems.....	19
12	ScreenYu Gyn®-prestanda.....	23
12.1	Analytisk prestanda	23
12.1.1	Analytisk sensitivitet	23
12.1.2	Analytisk specificitet – detektion av ometylerat DNA	24
12.2	Precision	25
12.2.1	Repeterbarhet.....	25
12.2.2	Reproducerbarhet.....	25
12.3	Tillförlitlighet	25
12.4	Noggrannhet	25
12.5	Robusthet	25
12.6	Cut-off (Gränsvärde)	25
12.7	Klinisk prestandautvärdering	26
13	Begränsningar för proceduren	27
14	Referenser	27
15	Ansvar.....	27
16	Frågor och problem.....	28
17	Ytterligare anmärkningar.....	28
18	Symbolernas betydelse	28
19	Förteckning över ändringar	29
20	Kort protokoll.....	29

1 AVSETT ÄNDAMÅL

ScreenYu Gyn® är ett in vitro-diagnostiskt kit för kvalitativ detektion av en human epigenetisk markör i bisulfitbehandlat DNA från cervixprover från kvinnor med ett positivt HPV-test eller med ett avvikande cellprov som kräver vidare utredning. Ett positivt resultat med ScreenYu Gyn® är associerat med förekomst av cervikal intraepitelial neoplasia eller livmoderhalscancer.

ScreenYu Gyn® är endast avsett att användas av kvalificerad laboratoriepersonal som är förtrogen med molekylärbiologiska tekniker. Tolkningen av resultaten ska alltid göras i samband med resultaten från ytterligare laboratediagnostiska procedurer, samt med beaktande av den kliniska bilden.

2 KLINISK BETYDELSE

Livmoderhalscancer är den fjärde vanligaste cancerformen hos kvinnor världen över, med över 600 000 nya fall varje år [1]. I praktiskt taget alla fall är en ihållande infektion med ett cancerframkallande humant papillomvirus (HPV) den bakomliggande orsaken [2] och en förutsättning för utvecklingen av livmoderhalscancer. HPV-negativa kvinnor har en extremt låg risk att utveckla livmoderhalscancer, men även de flesta kvinnor med HPV-infektion utvecklar inte ett precanceröst stadium. Endast cirka 15 % av kvinnor som är infekterade med HPV utvecklar faktiskt ett precanceröst stadium eller karcinom som kräver behandling [3].

Patienter med ett positivt HPV-testresultat och/eller med Pap-resultat som väntar på klargörande (Pap II, Pap III och Pap IIID1 och D2) rekommenderas därför att använda ett triagetest som ScreenYu Gyn® för att med hög noggrannhet fastställa sannolikheten för förekomst av cancer eller dess förstadiet.

ScreenYu Gyn® bör inte betraktas som det slutgiltiga terapeutiska beslutet och måste analyseras tillsammans med andra medicinska fynd.

3 TESTPRINCIP

ScreenYu Gyn® baseras på detektering av en epigenetisk biomarkör, dvs. metylering av en specifik DNA-sektion, vars förekomst motsvarar förekomsten av precancerösa lesioner eller livmoderhalscancer [4, 5, 6]. Dessutom analyseras en bisulfit-specifik referensmarkör. De markörregioner som används visas i tabellen nedan.

Översikt över markörregioner

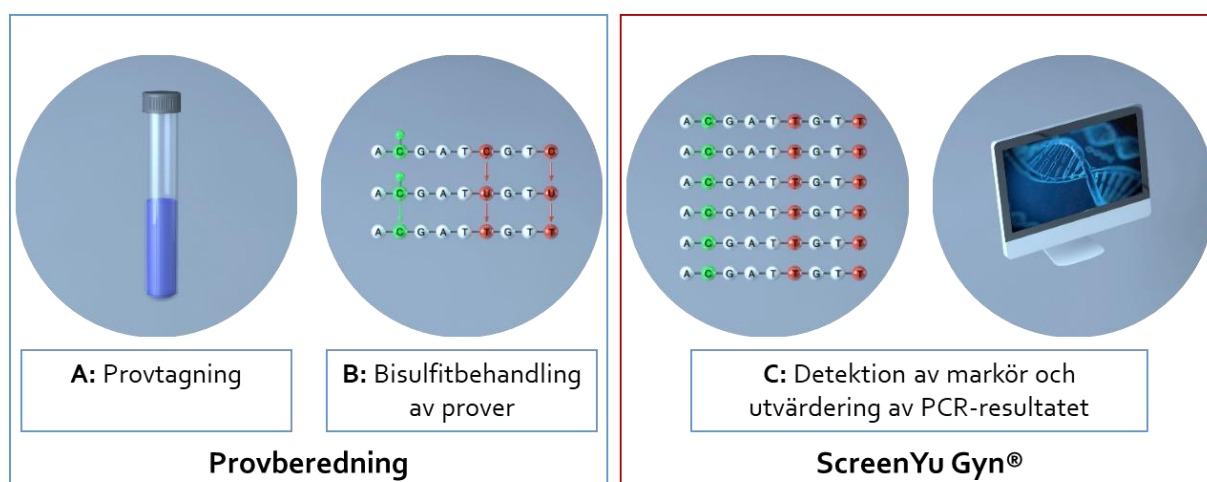
Beteckning i protokollet	Markörregion (genbeteckning)	Fluorescerande färgämne
Metyleringsmarkör	ZNF671	ROX
Kontrollmarkör	ACTB	FAM

Detektion utförs med hjälp av den högkänsliga sondbaserade realtids-PCR-metoden. Resultatet från realtidsinstrumenten är Cp-värdet (korspunkt, cobas z 480 Analyser) eller Cq-värdet (cykelkvantifiering, CFX96 Real-Time PCR Detection Systems), som båda motsvarar cykelgränsvärdet Ct och även kallas så nedan. Detta värde motsvarar cykeln i en realtids-PCR där fluorescensen för första gången stiger över ett definierat tröskelvärde.

Analysen av ett patientprov med ScreenYu Gyn® sker i två steg.

Först omvandlas DNA från livmoderhalssvabb med bisulfit och metyleringen fixeras. I det andra steget analyseras det eluerade, bisulfitbehandlade DNA:t i en metyleringsspecifik, sond-baserad realtids-PCR. Den ursprungligen metylerade DNA-sektionen amplifieras selektivt med hjälp av primrarna i ScreenYu Gyn® Strips. Detektion av metylerings- och kontrollmarkören utförs med hjälp av sonder märkta med fluorescerande färgämnen. Dessutom ingår en positiv och en negativ kontroll för att bekräfta PCR. Därefter utförs den assay-specifika analysen.

Provtagningen och bisulfitkitet ingår inte i ScreenYu Gyn® Kit. Produkter som är särskilt utformade för provtagning och bisulfitbehandling finns att köpa separat.



Testprincip

A: Gynekologen tar ett cellprov från patientens livmoderhals med hjälp av ett lämpligt provtagningskit.

B: Diagnostiklaboratoriet utför bisulfitbehandling på patientprovet.

C: En duplex-PCR-reaktion utförs per prov. Analysen utförs genom att detektera de färgmärkta sönerna som ingår i ScreenYu Gyn® Strip.

4 SCREENYU GYN®-TESTETS UTFORMNING

4.1 ScreenYu Gyn® Strips

ScreenYu Gyn® är en TaqMan-sond-baserad analys. En ScreenYu Gyn® Strip är en PCR-strip med 8 rör som innehåller två primerpar i varje rör, samt en tillhörande sond för amplifiering av den metyleringsspecifika markören ZNF671 och kontrollmarkören ACTB. En rör av en ScreenYu Gyn® Strip krävs för analys av ett patientprov.

4.2 Kontroller

ScreenYu Gyn® Kit innehåller tre kontroller för att övervaka provkvaliteten och bisulfitbehandlingen (ACTB-markör) samt kvaliteten på PCR-reaktionen (positiv kontroll och negativ kontroll).

4.2.1 Kvalitetskontroll av bisulfitbehandling (kontrollmarkör ACTB)

Denna kontrollmarkör verifierar att alla icke-metylerade cytosiner har omvandlats till uracil och därmed kvaliteten på den utförda bisulfitbehandlingen. Detektion utförs genom amplifiering av ett DNA-fragment nära den humana genen beta-aktin (ACTB). Om det inte sker någon ACTB-amplifiering med ett Ct-värde under 32 anses analysen av provet ogiltig och måste upprepas.

4.2.2 Positiv kontroll

Den positiva kontrollen övervakar kvaliteten på PCR. Amplifieringen av ScreenYu Gyn® Positive Control (PC) bör ge ett Ct-värde under 38 för både metyleringsmarkören och kontrollmarkören. Annars är PCR ogiltig och måste upprepas.

4.2.3 Negativ kontroll

Den negativa kontrollen är en kontrollreaktion med ScreenYu Gyn® Water (NTC – No Template Control) som mall, som måste vara negativ i båda markörerna. Om Ct-värden förekommer i den negativa kontrollen är det mycket troligt att det föreligger kontaminering och ScreenYu Gyn®-analysen måste upprepas.

5 REFERENSMATERIAL

Det finns inget internationellt referensmaterial tillgängligt.

6 KITETS INNEHÅLL

Innehåll i ScreenYu Gyn® Kit

Beteckning av komponenter	Symbol	Innehåll	Volym/kvantitet SG001-46
ScreenYu Gyn® Mastermix		PCR Mastermix ¹ (2x)	1 x 0,55 ml
ScreenYu Gyn® Strips		8-rörig PCR-strip ²	6 strips
ScreenYu Gyn® Caps		Kapsyl för strip	6 kapslar
ScreenYu Gyn® Positive Control		Positiv kontroll	1 x 90 µl
ScreenYu Gyn® Water		Vatten	1 x 2 ml
Bruksanvisning	-	Bruksanvisning	1

¹ Innehåller alla komponenter som krävs för polymeraskedjereaktion (PCR), förutom primrar, sonder och mall.

² Innehåller de primrar och prober som krävs för PCR.

7 FÖRBRUKNINGSMATERIAL OCH UTRUSTNING (INGÅR INTE I KITET)

ScreenYu Gyn® får endast användas tillsammans med de angivna förbrukningsvarorna och utrustningen och endast av kvalificerad personal. All nödvändig laboratorieutrustning måste installeras, kalibreras, hanteras och underhållas enligt tillverkarens anvisningar.

Rumstemperatur definieras som mellan 15 °C och 30 °C.

Nödvändig utrustning

Utrustning	Katalognummer	Företag
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

* Används som *Balance Strips* i PCR, se plattlayout på sidan 15 eller sidan 19 .

Följande laboratorieutrustning och förbrukningsmaterial krävs för att utföra ScreenYu Gyn®-analysen.

- Centrifug för 0,5 ml/1,5 ml reaktionsrör, $\geq 10\,000 \times g$
- Centrifug för PCR-strips
- Termocykler för 0,5 ml reaktionsrör
- Vortexblandare/skakapparat
- Pipetter med olika volymintervall och tillhörande filterspetsar (sterila, DNAs-fria)
- Reaktionsrörsställ för 0,5 ml/1,5 ml/2 ml reaktionsrör
- 96-håls rack för PCR-strips
- Reaktionsrör för 0,5 ml/1,5 ml (DNAs-fria)
- Etanol 96–100 %, odenaturerad
- Realtids-PCR-maskin, detektionskanaler för sondfärgerna FAM och ROX

ScreenYu Gyn® har validerats på följande realtids-PCR-maskiner:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) med 96-hålsblock, adapter för PCR-strips och LightCycler® 480 Software UDF 2.0.0 (Service Pack 3), utvärdering med version 1.5.1.62
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) med CFX Maestro-software version 2.3

8 FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Om ScreenYu Gyn® Kit och dess komponenter transporteras och förvaras på rätt sätt kan de användas fram till angivet datum. Alla reagenser i kitet är stabila fram till angivet utgångsdatum efter öppnandet, om de förvaras under angivna förhållanden och skyddas mot kontaminering.

Förvaringstemperatur för ScreenYu Gyn® Kit och utrustning som inte ingår i kitet

Utrustning	Förvaringstemperatur
ScreenYu Gyn® Kit	2 °C till 8 °C
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE IVD)	15 °C till 30 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C till 30 °C
Cervex-Brush® eller Cervex-Brush® Combi	15 °C till 30 °C

9 SÄKERHETSANVISNINGAR

9.1 Allmän information

Vid etablering av moderna molekylärbiologiska metoder måste nedanstående instruktioner följas noggrant för att säkerställa maximal säkerhet för laboratoriepersonal och för att uppnå högkvalitativa resultat:

- Eftersom det rör sig om molekylärbiologiska processer, såsom bisulfitbehandling, amplifiering och detektion av DNA, är detta kit endast avsett för in vitro-diagnostik och bör endast användas av personal som är utbildad i laboratoriepraxis för in vitro-diagnostik.
- Läs igenom bruksanvisningen noggrant innan du använder produkten. Endast den aktuella versionen ska beaktas.
- Bär lämplig laboratorierock, engångshandskar och, om nödvändigt, skyddsglasögon vid varje steg.
- Undvik direkt kontakt med de biologiska proverna, samt risk för stänk eller aerosoler från proverna.
- PCR-maskinernas uppvärmda lock och inkubationsblock kan nå temperaturer upp till 110 °C. Det finns risk för brännskador på huden. Följ bruksanvisningen för apparaten.
- Tvätta händerna noggrant efter hantering av prover och reagenser.
- Använd inte ScreenYu Gyn® om reagensförpackningen är skadad. I så fall kontakta din distributör.
- Använd inte ScreenYu Gyn® Kit efter utgångsdatumet och använd inte utgångna reagenser.
- Blanda inte reagenser från olika batcher och blanda inte kitreagenser med reagenser från andra tillverkare.
- Använd endast material som medföljer kitet eller som rekommenderas av tillverkaren.
- All nödvändig laborieutrustning måste installeras, kalibreras, hanteras och underhållas enligt tillverkarens anvisningar.
- Pipettering av små volymer vätska i mikroliterområdet kräver övning. Se till att du pipetterar de erforderliga volymerna med mikropipetterna så exakt som möjligt.
- Gällande lagkrav för operatören måste följas.

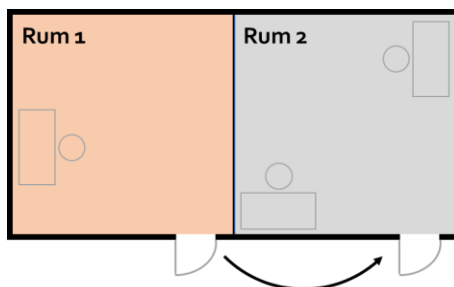
- Det förutsätts att god laboratoriesed (GLP) följs, såsom den beskrivs av exempelvis amerikanska Food and Drug Administration (FDA) eller Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD). Specifikt bör rekommendationer för utförandet av molekylära amplifieringstester beaktas.
- PCR-utrustningens korrekta funktion garanteras endast vid rumstemperatur.

9.2 Rummets utformning

På grund av PCR:s höga analytiska känslighet bör man vara mycket noga med att upprätthålla renheten hos kitkomponenterna och proverna.

PCR multiplicerar delar av DNA i provet miljoner till miljarder gånger. Även de minsta mängderna av dessa PCR-produkter (t.ex. även spridda som aerosol) kan leda till ett felaktigt resultat om de överförs till provmaterialet, till reagensen för bisulfitbehandling eller till PCR-reagenserna i detta kit.

Ett rent och välstrukturerat arbetsflöde är därför avgörande för att förhindra felaktiga resultat. För detta ändamål är det nödvändigt att separera laboratorieutrymmena för pre-PCR och post-PCR från varandra. Separat utrustning, förbrukningsmaterial, laboratorierockar och handskar bör finnas tillgängliga i varje område. Flytta aldrig laboratorierockar, handskar eller utrustning från ett område till ett annat. Figuren nedan visar ett exempel på ett laboratorium uppdelat i två separata rum. Det ena området är endast avsett för bisulfitbehandling och förberedelse av PCR, medan PCR utförs i det andra området.



Rumsindelning

Bisulfitbehandlingen av proverna samt hela PCR-förberedelsen utförs i rum 1 (användning av en PCR-huv är optimalt). I rum 2 utförs, detekteras och analyseras PCR.

9.3 Undvika kontaminering

- Labbrockar och engångshandskar måste bäras under alla steg.
- Engångshandskar ska bytas ofta och alltid efter (misstänkt) kontaminering med reagenser eller provmaterial.
- Alla ytor, utrustning och förbrukningsmaterial måste dekontamineras med en lämplig rengöringslösning (DNA-förstörande medel).
- Rör inte insidan av reaktionsrören eller deras lock.
- Vid pipettering måste alltid filterspetsar (fria från DNAs, RNAs och humant DNA) användas för att utesluta korskontaminering via aerosoler som genereras under pipetteringen. Spetsarna ska alltid bytas mellan pipetteringsstegen.
- Det är viktigt att utföra negativa kontroller för att upptäcka eventuell kontaminering.

9.4 Hanteringsanvisningar

- Förvara oanvända komponenter i originalförpackningen tills de ska användas.
- Alla centrifugeringar ska utföras vid rumstemperatur.

- Arbetsflödet kan avbrytas efter bisulfitbehandlingen. Vid detta tillfälle kan proverna förvaras i en vecka vid 2 °C till 8 °C eller upp till två månader vid – 15 °C till – 30 °C.
- ScreenYu Gyn® Strips och ScreenYu Gyn® Caps får inte beröras utan engångshandskar under hela proceduren, annars kan ospecifika fluorescenssignaler uppstå.
- ScreenYu Gyn® Strips och ScreenYu Gyn® Caps är avsedda för engångsbruk och kan inte återanvändas.
- Förvara oanvända ScreenYu Gyn® Strips och ScreenYu Gyn® Caps i originalförpackningen. Det är mycket viktigt att du förvarar ScreenYu Gyn® Strips skyddade från ljus.

10 AVFALLSHANTERING

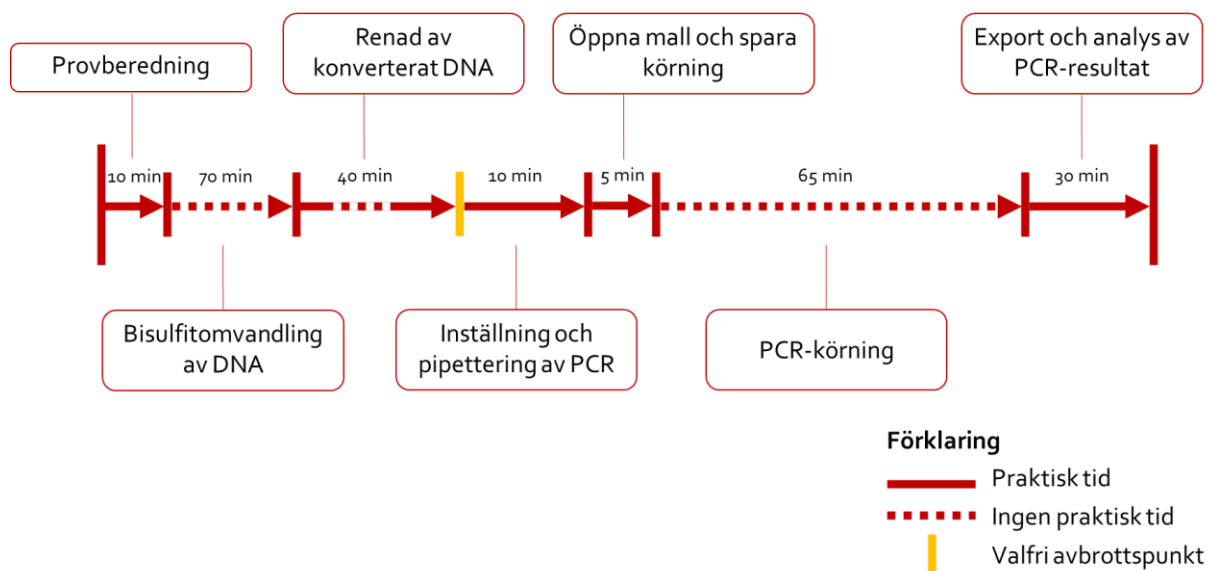
Oanvända ScreenYu Gyn® Kit och dess komponenter kan kasseras utan ytterligare särskilda försiktighetsåtgärder. Patientprover och använda reaktionsrör måste hanteras som smittsamt avfall. Alla reagenser måste kasseras i enlighet med gällande lagstiftning.

11 SCREENYU GYN®-PROCEDUR

Följande kapitel innehåller en detaljerad beskrivning av de olika stegen från provtagning till dataanalys.

11.1 Arbetsflöde

Totalt kan ScreenYu Gyn® utföras på mindre än fyra timmar. Den aktiva arbetstiden är cirka 2 timmar. Under den första ScreenYu Gyn®-proceduren bör 15 minuter avsättas för att ställa in PCR-programmet.



Tidsplan för ScreenYu Gyn®-arbetsflödet

11.2 Provtagning

Provtagningsattsan ingår inte i ScreenYu Gyn® Kit. ThinPrep® PreservCyt® provtagningsburkar (Hologic, Inc.) och Cervex-Brush® cellprovsborstar (Rovers Medical Devices) kan beställas från respektive tillverkare. Läkaren ska ta cervixprovet i enlighet med tillverkarens anvisningar och i enlighet med allmänt vedertagna riktlinjer för provtagning av cervixsmear [7].

Viktigt: Borsthuvudet av cellprovsborsten får inte lämnas kvar i provtagningsburken efter provtagningen, eftersom detta kan försämra ScreenYu Gyn®-testets prestanda.

ThinPrep® PreservCyt® Solution måste användas som provmedium. Användning av andra provmedier ingick inte i valideringen av ScreenYu Gyn®-testet.

Att säkerställa god kvalitet på det använda DNA-provet är en viktig förutsättning för testets giltighet. Felaktig provtagning, bisulfitbehandling och DNA-lagring kan leda till ogiltiga eller till och med falskt negativa resultat.

Cervikala prover kan transporteras till laboratoriet för testning utan kylning. Proverna kan förvaras i upp till 1,5 år vid en temperatur mellan 2 °C och 30 °C.

11.3 Provberedning

Följande steg måste utföras i provberedningsområdet (rum 1).

Viktigt: Om borsthuvudet på cellprovsborsten befinner sig inuti provflaskan måste det först avlägsnas och kasseras.

- Vortexa alla patientprover i 5 sekunder vid maximal hastighet och överför omedelbart 1 ml av mediet till ett 1,5 ml reaktionsrör.

Varning: Cellerna sjunker mycket snabbt till botten av röret. Det får inte gå mer än 10 sekunder mellan blandningen av patientprovet och provtagningen av 1 ml!

- Centrifugera proverna i **5 minuter** vid **10 000 xg**.
- Ta försiktigt bort 900 µl supernatant ovanför pelleten utan att förstöra pelleten.

Varning: Beroende på provets beskaffenhet är pelleten mer eller mindre fast.

- Resuspendera pelleten genom att vortexa i 3 sekunder. Använd 20 µl av det resuspenderade provet i bisulfitbehandlingen. Kassera de återstående 80 µl.

11.4 Bisulfitbehandling av prover

Bisulfitkitet ingår inte i ScreenYu Gyn®-kitet. ScreenYu Gyn® har validerats med EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH).

- **Input:** Blanda **20 µl** av det **resuspenderade provet** med **130 µl Lightning Conversion Reagent** i ett 0,5 ml reaktionsrör.
- Utför bisulfitbehandling enligt tillverkarens anvisningar för EZ DNA Methylation-Lightning Kit, med undantag för följande modifieringar:

- Kasta bort genomflödet efter det sista tvättsteget.
- Centrifugera kolonnen i det tomma Collection-Tube i **1 minut** vid **full hastighet** för att torka den helt.

Observera: Hoppa inte över detta steg, eftersom kvarvarande etanol kan försämra prestandan hos ScreenYu Gyn®-analysen.

- Eluera i **15 µl M-Elution Buffer** genom centrifugeringen för **30 sekunder** vid **8 000 xg**.

11.5 PCR

Innan du startar PCR, se till att PCR-temperaturprotokollet är programmerat i lämplig realtids-PCR-enhet för att minimera tiden mellan förberedelse och PCR-start. För att ställa in PCR-programmet på cobas z 480 Analyzer, följ anvisningarna på sidan 14. Förklaringen för PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems finns på sidan 19 och framåt.

11.5.1 Förberedelse och pipettering av PCR

Viktigt: Förberedelse och pipettering av PCR bör inte ta längre tid än 60 minuter. Detta steg utförs i rum 1 (pre-PCR-området).

Observera plattans layout som beskrivs på sidan 15 respektive 19. Den positiva kontrollen (PC) måste pipetteras i rör A1 och den negativa kontrollen (NTC) i rör B1.

- Ta ut **ScreenYu Gyn® Mastermix** och erforderligt antal **ScreenYu Gyn® Strips** från kitet och placera dem på ett 96-brunnsställ.

Varning: En **ScreenYu Gyn® Strip** räcker för åtta PCR-analyser. Observera att en positiv kontroll och en negativ kontroll (vatten, NTC) måste utföras för varje PCR-körning.

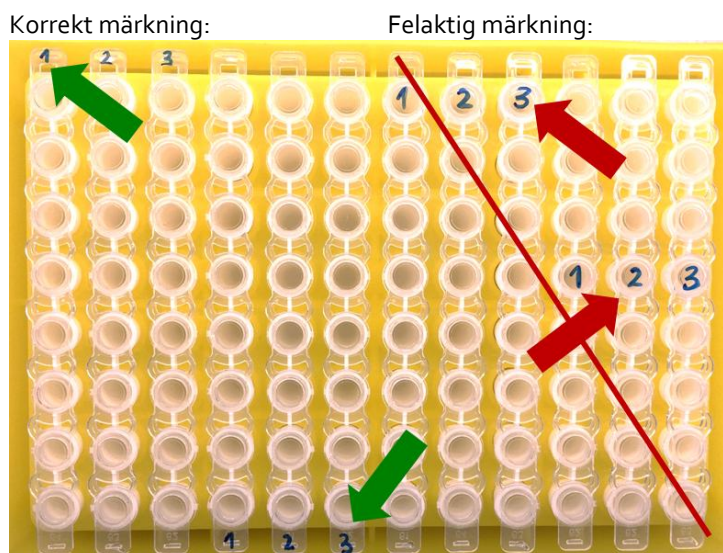
- Vortexa **ScreenYu Gyn® Mastermix** i 3 sekunder vid maximal hastighet och centrifugera av den.
- Ta bort **PCR-locken** från **ScreenYu Gyn® Strips** och **kasta** dem.
- Tillsätt **10 µl ScreenYu Gyn® Mastermix** till varje rör i **ScreenYu Gyn® Strip**.
- Vortexa provelutaten i 3 sekunder vid maximal hastighet och centrifugera kort.
- Tillsätt **10 µl av provet** till rören fylld med **ScreenYu Gyn® Mastermix**.

Viktigt: Byt pipettspets för varje pipetteringssteg.

Obs: Spara resten av proveluatet för en eventuell upprepning av **ScreenYu Gyn® PCR**.

- Vortexa **ScreenYu Gyn® Positive Control** i 3 sekunder vid maximal hastighet och centrifugera av den.
- Tillsätt **10 µl ScreenYu Gyn® Positive Control** till rör A1 och **10 µl ScreenYu Gyn® Water** till rör B1 som negativ kontroll.
- Stäng varje **ScreenYu Gyn® Strip** med en oanvänd **ScreenYu Gyn® Cap** (transparent påse).

Varning: Rör inte insidan av **ScreenYu Gyn® Strips** och **ScreenYu Gyn® Caps**. Se till att **ScreenYu Gyn® Cap** sitter ordentligt på **ScreenYu Gyn® Strip** efter stängning. Verifiering görs bäst genom visuell inspektion från sidan.



Varning:

Märk inte den del av locken som ligger direkt ovanför PCR-rör, eftersom PCR-signalen avläses ovanifrån genom locken och detta skulle leda till felaktiga fluorescenssignaler.

Den stora spärren på lockets ovansida och undersida kan användas för märkning.

- Vortexa alla stängda **ScreenYu Gyn® Strips** i 3 sekunder vid maximal hastighet och centrifugera dem.

11.5.2 Utförande av PCR-reaktionen på cobas z 480 Analyzer

I följande avsnitt beskrivs hur ScreenYu Gyn® utförs på realtids-PCR-systemen cobas z 480 Analyzer (markerad med blått) och CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (markerad med grönt). Följ dock alltid tillverkarens anvisningar för användning av PCR-utrustning.

PCR ska utföras i rum 2.

11.5.2.1 Skapa en PCR-programm

Om du har skapat och sparat PCR-programmet tidigare kan du fortsätta med 11.5.2.2 *Starta PCR-körningen*.

- Slå på cobas z 480 Analyzer och dess dator. Välj "User defined Workflow" på datorskärmen i BIOS inom 15 sekunder för att växla till ett fritt programmerbart enhetsläge.
 - Öppna programvaran och logga in.
 - Välj "Verktyg"  i åtgärdsfältet till höger och skapa ett nytt *Detection Format*. Namnge det *ScreenYu Gyn*. Välj filterkombinationen 465-510 och 540-610 (excitation-emission). Stäng fönstret genom att klicka på knappen *Close*.
 - Välj *New Experiment* för att skapa en ny program.
- I fliken *Run Protocol* ställer du in *Detection Format* till *ScreenYu Gyn* och *Reaction Volume* till 20 µl. Programmera temperaturprotokollet enligt tabellen nedan.

PCR-temperaturprotokoll på cobas z 480 Analyzer

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

- Spara körningsprogrammet under namnet *ScreenYu Gyn* genom att välja *Apply Template* → *Save as Template* och spara programmet på önskad plats.

11.5.2.2 Starta PCR-körningen

Om du har sparat PCR-programmet tidigare kan du nu öppna den genom att klicka på *New Experiment from Template* → *ScreenYu Gyn*. Kontrollera att rätt temperaturprotokoll är inställt.

- Beroende på plattans layout väljer du en *Subset Template* i *Subset Editor*. För att göra detta trycker du på knappen "+", markerar alla upptagna rör i layouten och bekräftar programmet med knappen *Apply*. Denna *Subset Template* kan sparas på önskad plats via *Apply Template* → *Save as Template*.
- Välj en lämplig plattlayout:

	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											

Exempel på plattlayout för 6 patientprover (1–6)

Analys av en ofullständigt fylld platta utförs med hjälp av en definierad delmängd 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						

Exempel på plattlayout för 46 patientprover (1–46)

Analys av en ofullständigt fylld platta utförs med hjälp av en definierad delmängd i *Subset Editor*.

Viktigt: Plattans layout är inte variabel. Den positiva kontrollen (PC) måste placeras i brunn A1 och den negativa kontrollen (NTC) i brunn B1.

Tomma positioner ska fyllas med tomma 8-rör strips (Balance Strips) för balansering, se kapitel 7.

- Definiera provmärkningen i *Sample Editor* genom att välja en definierad delmängdsmall i *steg 2: Select Samples* → *Subset* och ange *Sample Name* i *steg 3: Edit Properties*. Denna provmall kan sparas på önskad plats via *Apply Template* → *Save as Template*.
- Placera strips vertikalt i PCR-enheten i den angivna ordningen.
Viktigt: Använd adaptorn för PCR-strips (från Roche Diagnostics GmbH).
- Spara PCR-körningen under ett unikt namn i önskad mapp genom att trycka på floppy disk-knappen (till höger på åtgärdsfältet) och starta PCR-körningen genom att klicka på knappen *Start Run* i fliken *Run Protocol* (*Experiment Editor*).

11.5.2.3 Exportera data

Om du analyserar PCR-körningen direkt på cobas z 480 Analyzer-datorn, fortsätt med 11.5.2.4 *Analysera PCR-data*.

- När PCR-analysen är klar (*Run complete*) exporterar du den via  "Export" och sparar filen på önskad plats.

11.5.2.4 Analysera PCR-data

Nedan beskrivs analysen av de exporterade data. Dessa instruktioner har skapats med hjälp av kalkylprogrammet Microsoft Excel. Det är även möjligt att använda andra lämpliga program.

- Om du har exporterat PCR-körningen startar du LightCycler® 480-programvaran på en annan dator och öppnar/importerar PCR-körningen. I annat fall utför du analysen på datorn till cobas z 480 Analyzer.
- Under *Analysis* väljer du analysalgoritmen *Abs Quant/Fit Points* och den angivna delmängden, om det behövs.
- I fliken *Cycle Range* ställer du in följande parametrar: *First Cycle* 1, *Last Cycle* 42 och *Background* till 5 till 20, genom att ställa in *Min Offset* på 4 och *Max Offset* på 19.
- Kontrollera under fliken *Noise Band* att *STD Multiplier* är inställd på 12 och att *Noise Band* beräknas automatiskt.
- På grund av detekteringen av två olika fluorescerande färgämnen utförs analysen av PCR-data separat för varje markör. Respektive detekteringskanal väljs via knappen *Filter Comb*:

Filterkombinationer och tröskelvärdesinställningar på cobas z 480 Analyzer

Markör	Detektionskanal	Sond	Threshold
ACTB	465 – 510	FAM	1,2
ZNF671	540 – 610	ROX	0,5

- Kontrollera att antalet *Fit Points* är inställt på 2 under fliken *Analysis*.
- För **ACTB** väljer du *Filter Comb 465 - 510* och ställer in *Threshold* till **1,2** och trycker på knappen *Calculate* för att utföra analysen. Exportera datatabellen som en .txt-fil genom att högerklicka på *Export Table* under *Samples* och spara den på en lämplig plats under ett unikt namn.
- Välj sedan *Filter Comb 540 - 610* för **ZNF671**, ställ in *Threshold* till **0,5** och tryck på knappen *Calculate* för att utföra analysen. Exportera datatabellen som en .txt-fil genom att högerklicka på *Export Table* under *Samples* och spara den på en lämplig plats under ett unikt namn.

Varning: Analysera alltid de två markörerna efter varandra enligt beskrivningen, eftersom programmet alltid tillämpar manuellt inställda tröskelvärden på alla filter.

- Öppna ett kalkylprogram som Microsoft Excel och kopiera alla data från båda .txt-filerna, både för ZNF671-markören (valt filter: 540-610) och för ACTB-markören (valt filter: 465-510), till det.
- Formatera data så att resultaten för de olika proverna visas under varandra och markörerna ZNF671 och ACTB visas bredvid varandra.

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

Kontrollera giltigheten av PCR-körningen

PCR-körningen är giltig om den positiva och negativa kontrollen uppfyller följande kriterier:

Giltighetskriterier för ScreenYu Gyn®-kontrollerna

Markör	Cp-värde för positiv kontroll	Cp-värde för negativ kontroll
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	inget värde
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	inget värde

Kontroll av provens giltighet

Resultatet av patientprovet är giltigt om kontrollmarkören ACTB uppfyller följande kriterium:

Giltighetskriterier för patientprovet

Markör	Cp-värde för patientprovet
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Analys av ScreenYu Gyn®-testet

Om metyleringsmarkören ZNF671

- inte ger något Cp-värde, kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som negativt**.
- ger ett Cp-värde $> 0; < 20$, kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som ogiltigt**.
- ger ett Cp-värde $\geq 20; \leq 42$, beräknas ΔCp enligt följande ekvation:

Beräkning av ΔCp

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

Om $\Delta C_p \leq 9,00$ kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som positivt**.

Om $\Delta C_p > 9,00$ kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som negativt**.

Ett positivt ScreenYu Gyn®-resultat är förknippat med förekomst av cervikal intraepitelial neoplasia eller livmoderhalscancer. ScreenYu Gyn® ska inte betraktas som det slutgiltiga terapeutiska beslutet och måste analyseras tillsammans med andra medicinska fynd.

11.5.3 Utförande av PCR på CFX96 Real-Time PCR Detection Systems

11.5.3.1 Skapa en PCR-programm

- Slå på PCR-maskinen.
- Programmera PCR-temperaturprotokollet enligt beskrivningen i tabellen nedan genom att välja och redigera temperatursteg och tider.

*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		GÅ TILL Step 2	41 x
Cooling	5	1 x	30 °C	1:00

* Fluorescenssignalen detekteras via "Plate Read" under Step 3, vilket symboliseras av kamerasymbolen.

** På CFX96 Real-Time PCR Detection Systems är standardhastigheten 5 °C/sek. Denna inställning användes för att validera detta IVD-test.

- Ställ in reaktionsvolymen på 20 µl och temperaturen på lockvärmaren på 105 °C.
- Spara PCR-programmet med namnet *ScreenYu Gyn*.

11.5.3.2 Starta PCR-körningen

Om du har sparat PCR-programmet tidigare kan du nu öppna den. Kontrollera att rätt temperaturprotokoll är inställt.

- Placera **ScreenYu Gyn® Strips** i PCR-enheten genom att sätta in dem vertikalt i de små brunnarna i värmeblocket. Välj en lämplig plattlayout.

	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											

Exempel på plattlayout för 6 patientprover (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						

Exempel på plattlayout för 46 patientprover (1–46)

Viktigt: Plattans layout är inte variabel. Den positiva kontrollen (PC) måste placeras i brunn A1 och den negativa kontrollen (NTC) i brunn B1.

Tomma positioner ska fyllas med tomma strips (Balance Strips) för balansering, se kapitel 7.

- Namnge körningen med ett lämpligt filnamn. Observera att *All Channels* detekteras innan du startar körningen.

11.5.3.3 Exportera data

- När PCR är klar exporterar du PCR-körningen (.pcrd-fil).

11.5.3.4 Analysera PCR-data

Nedan beskrivs analysen av de exporterade data.

- Öppna BioRad CFX-programvaran på en dator och ställ först in *Plate Type: BR White* under User → *User Preferences* → *Plate* för att ange att vit plast används.
- Importera .pcrd-filen.
- Definiera plattans layout under *Plate Setup* → *View/Edit Plate*. Klicka på knappen *Select Fluorophores* för att välja de använda färgämnen FAM och ROX. Motsvarande markörer ACTB (FAM) och ZNF671 (ROX) kan väljas under *Target Names*. Ange namnet under *Sample Names*.
- Oanvända positioner markeras och kan uteslutas från analysen genom att markera *Exclude Wells in Analysis*.
- Bekräfta plattlayouten under *OK*.
- Ställ in analysinställningarna under *Settings*. Parametrarna under *Baseline Threshold* måste definieras separat för varje fluorofor. För detta ändamål måste markörerna i fliken *Quantification* avmarkeras eller markeras.

Analysinställningar på 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

- Markera alla prover och exportera data för båda markörerna samtidigt som en .xlsx-fil till en lämplig plats under ett unikt namn genom att högerklicka på *Export to Excel*.
- Formatera data så att resultaten för de olika proverna visas under varandra och markörerna ZNF671 och ACTB visas bredvid varandra.

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

Kontrollera giltigheten av PCR-körningen

PCR-körningen är giltig om de positiva och negativa kontrollerna uppfyller följande kriterier:

Giltighetskriterier för ScreenYu Gyn®-kontroller

Markör	Cq-värde för positiv kontroll	Cq-värde för negativ kontroll
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	inget värde
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	inget värde

Kontroll av provens giltighet

Resultatet av patientprovet är giltigt om kontrollmarkören ACTB uppfyller följande kriterium:

Giltighetskriterier för patientprovet

Markör	Cq-värde för patientprovet
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Analys av ScreenYu Gyn®-testet

Om metyleringsmarkören ZNF671

- inte ger något Cq-värde, kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som negativt**.
- ger ett Cq-värde > 0 ; < 20 , kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som ogiltigt**.
- ger ett Cq-värde ≥ 20 ; ≤ 42 , beräknas ΔCq enligt följande ekvation:

Beräkning av ΔCq

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

Om $\Delta Cq \leq 10,00$ kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som positivt**.

Om $\Delta Cq > 10,00$ kommer **ScreenYu Gyn®-resultatet** för detta prov att betraktas **som negativt**.

Ett positivt ScreenYu Gyn®-resultat är förknippat med förekomst av cervikal intraepitelial neoplasia eller livmoderhalscancer. ScreenYu Gyn® ska inte betraktas som det slutgiltiga terapeutiska beslutet och måste analyseras tillsammans med andra medicinska fynd.

12 SCREENYU GYN®-PRESTANDA

Prestanda för CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System visas. Om data avviker från cobas z 480 Analyzer anges detta separat. Om data från cobas z 480 Analyzer inte uttryckligen visas, motsvarar de data som visas för CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

12.1 Analytisk prestanda

12.1.1 Analytisk sensitivitet

Den analytiska sensitiviteten för PCR-analysen bestämdes med hjälp av metylerat bisulfitkonverterat humant genom-DNA. Respektive detektionsgränser anges i följande tabell. Spädningsserierna testades i 9-faldig bestämning. I genomsnitt används 120 – 180 ng DNA i analysen för ett patientprov.

Analytisk sensitivitet – Del 1

Använt DNA	Ungefärligt antal 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 cell	5 / 9	3 / 9

* en cell innehåller cirka 6 - 7 pg genomiskt DNA

Detektionsgränsen för de två markörerna på CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System är totalt 3 celler (0,02 ng) i det totala provet.

På cobas z 480 Analyzer är detektionsgränsen för de två markörerna totalt 7,5 celler (0,05 ng) i det totala provet.

Kvantifieringsgränserna för ScreenYu Gyn®-analysen motsvarar detektionsgränserna, vilket resulterar i en linearitet på $R^2 = 0,99$ för båda markörerna inom kvantifieringsgränserna.

Dessutom testades en DNA-blandning av metylerat bisulfitkonverterat genomiskt humant DNA och ometylerat genomiskt humant DNA. I varje fall användes 20 ng DNA eller 100 ng DNA per analys. Spädningsserierna testades i tre replikat eller i 9-faldig bestämning.

Analytisk sensitivitet – Del 2

Andel metylerat 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

Detektionsgränsen för ett positivt resultat av markören ZNF671 är 0,1 % metylerat DNA för ett prov som innehåller totalt 20 ng DNA eller 100 ng DNA per analys.

12.1.2 Analytisk specificitet – detektion av ometylerat DNA

Den analytiska specificiteten för PCR-analysen bestämdes med hjälp av ometylerade PCR-fragment på 10 – 12 kb som representerar det mänskliga genomet. En femfaldig bestämning utfördes. Resultaten visas i tabellen nedan. Proverna klassificerades som giltiga via ACTB-markören. Upp till en koncentration av 1 000 ng ometylerat, bisulfitkonverterat DNA (biDNA) erhöles inga falskt positiva ScreenYu Gyn®-resultat.

Analytisk specificitet för PCR-analysen

Använt DNA	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
100 ng ometylerat biDNA	0 / 5	5 / 5
250 ng ometylerat biDNA	0 / 5	5 / 5
500 ng ometylerat biDNA	0 / 5	5 / 5
1 000 ng ometylerat biDNA	0 / 5	5 / 5
1 000 ng genomiskt DNA	0 / 5	0 / 5

12.2 Precision

12.2.1 Repeterbarhet

Två bisulfitkonverterade patientprover testades i tio oberoende körningar med ScreenYu Gyn®-analysen (4 replikat vardera). I alla 40 bestämningar hade Pap I-provet ett negativt ScreenYu Gyn®-resultat och CIN3 hade ett positivt ScreenYu Gyn®-resultat. Proverna uppvisar således 100 % repeterbarhet.

12.2.2 Reproducerbarhet

Vid fem center testades 20 patientprover med ScreenYu Gyn®. Varje gång utfördes en ny provberedning och bisulfitbehandling av olika personer med olika qPCR-system (cobas z 480 Analyzer, LightCycler® 480 I, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System).

18 av 20 patientprover var konsistenta. Detta ger en reproducerbarhet på 90 %.

12.3 Tillförlitlighet

Tillförlitligheten hos ScreenYu Gyn®-analysen verifierades via Sanger-sekvensering med 15 patientprover. Negativt testade patientprover visade inga metylerade cytosiner i respektive genomregion. Positivt testade patientprover visade korrekt ZNF671-genomregion med hög metyleringsgrad inom sekvensen.

12.4 Noggrannhet

Noggrannheten anges som summan av precision och tillförlitlighet för ScreenYu Gyn®-analysen.

12.5 Robusthet

Ingen interferens observerades i utstryksprover spetsade med SiHa-celler när ökade koncentrationer av följande ämnen tillsattes till provet:

- upp till 0,5 % Lugols lösning
- upp till 0,5 % ättiksyra

12.6 Cut-off (Gränsvärde)

Den optimala analysgränsen fastställdes med hjälp av det så kallade Youden-indexet. Följande kriterier måste uppfyllas för ett positivt ScreenYu Gyn®-resultat:

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

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

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

Cobas z 480 Analyzer

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

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

12.7 Klinisk prestandautvärdering

De patientprover som användes här erhöles från europeiska kliniker (Tyskland, Portugal).

Bisulfitbehandling av patientprover med EZ DNA Methylation-Lightning Kit utfördes med en centrifugeringshastighet på 18 000 xg och en desulfoneringstid på 20 minuter.

För den kliniska prestandautvärderingen av ScreenYu Gyn® undersöktes 616 patientprover med följande prevalensfördelning av fynden: Pap I (n = 380; 61,7 %), CIN 1 (n = 47; 7,6 %), CIN 2 (n = 50; 8,1 %), CIN 3 (n = 132; 21,4 %), livmoderhalscancer (n = 7; 1,1 %). Andelen ogiltiga prover var 1,3 % (n = 8).

Baserat på det fastställda gränsvärdet beräknades klinisk sensitivitet och specificitet.

Klinisk prestandautvärdering av ScreenYu Gyn®

Resultat enligt cytologi/histologi	Detektion	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 %

Kliniska prestationsdata CIN 3+ / Pap I	Värde	KI 95 %
Sensitivitet	64,75 %	56,2 % - 72,7 %
Specificitet	90,67 %	87,3 % - 93,4 %
Positivt prediktivt värde	72,00 %	63,3 % - 79,7 %
Negativt prediktivt värde	87,40 %	83,7 % - 90,5 %
Positiv sannolikhetskquot	6,96	-
Negativ sannolikhetskquot	0,39	-

KI = konfidensintervall

13 BEGRÄNSNINGAR FÖR PROCEDUREN

- Tolkningen av ScreenYu Gyn®-resultaten ska alltid göras i kombination med resultaten från ytterligare laboratoriediagnostiska procedurer, samt med hänsyn till den kliniska bilden.
- Specifikationerna enligt bruksanvisningen, t.ex. pipetteringsvolym, inkubationstider, temperaturer och förberedelsesteg, måste följas för att undvika felaktiga resultat.
- Korrekt provtagning och förvaring är avgörande för testresultaten.
- I princip kan det inte uteslutas i molekylärbiologiska testförfaranden att ytterligare mycket sällsynta sekvensvarianter kan påverka testresultatet, vilka ännu inte omfattas av de källor som konsulterats för specificitets- och känslighetsanalysen av primrarna och sönerna.
- Instrumentprestanda som inte uppfyller specifikationerna, liksom avvikelser från det beskrivna testförfarandet, angivna förvaringsförhållanden, material, utrustning eller rekommenderat provmaterial, kan leda till skillnader jämfört med resultat som erhålls när alla specifikationer uppfylls.
- De medföljande interna och externa kontrollerna är hjälpmedel för att upptäcka fel. De kan dock inte upptäcka alla möjliga fel. Det är användarens ansvar att validera eventuella modifieringar som gjorts eller, om nödvändigt, de enheter som används och att säkerställa att enhetsspecifikationerna följs.

14 REFERENSER

- [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 ANSVAR

ScreenYu Gyn® Kit får endast användas i enlighet med dess avsedda ändamål. Epitype GmbH tar inget ansvar för annan användning (t.ex. bristande efterlevnad av dessa bruksanvisningar och felaktig användning) och eventuella skador som uppstår till följd av detta.

16 FRÅGOR OCH PROBLEM

Om du har frågor eller problem med produkten, vänligen kontakta din Epitype GmbH-representant.

Du kan nå Epitype GmbH:s tekniska support måndag till fredag mellan kl. 8 och 16 på följande telefonnummer: +49 (0) 3641 5548500

Utanför kontorstid kan du skicka e-post till: support@epitype.de

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden, Deutschland (Tyskland)

Verkställande direktörer: Dr Alfred Hansel, Dr Martina Schmitz, Dr Timm Zörgiebel

17 YTTERLIGARE ANMÄRKNINGAR

- Regulatorisk information till kunder i Europeiska unionen: Observera att ni är skyldiga att rapportera alla allvarliga incidenter som inträffat i samband med produkten till behörig myndighet och till Epitype GmbH.
- Den aktuella versionen av säkerhetsdatabladet för denna produkt finns i nedladdningscentret på webbplatsen (<https://www.epitype.de/en/downloadcenter/>) eller kan beställas via e-post till support@epitype.de.

18 SYMBOLERNAS BETYDELSE

Symbol	Betydelse	Symbol	Betydelse
	Mastermix		Förvaringstemperatur
	PCR-strips		Om öppnad, användbar till (ÅÅÅÅ-MM-DD)
	Kapsyler		Innehållet räcker till <n> tester
	Positiv kontroll		Tillverkare
	Vatten		Följ bruksanvisningen
	in vitro-diagnostik		Skydda mot solljus
	Partibeteckning		Återanvänd inte
	Referensnummer		CE-märkning

19 FÖRTECKNING ÖVER ÄNDRINGAR

Tidigare version (Utgivningsdatum)	Ändringar
8 (2025-09)	Korrigerings av översättningsfel: - Korrigerings av kapitelrubriker • 12.3 Noggrannhet → Tillförlitlighet • 12.4 Precision → Noggrannhet • 12.6 Cut-off → Cut-off (Gränsvärde) - Korrigerings av meningar i kapitel 12.3: • Tillförlitligheten hos ScreenYu Gyn®-analysen verifierades via Sanger-sekvensering med 15 patientprover. - Korrigerings av meningar i kapitel 12.4: • Noggrannheten anges som summan av precision och tillförlitlighet för ScreenYu Gyn®-analysen. Optimering av sidfoten i kortprotokollet, version av IFU refereras till

20 KORT PROTOKOLL

Nedan hittar du en mall för en snabbguide i form av en checklista.

Innan du använder snabbguiden ska du läsa igenom bruksanvisningen som beskrivs i detalj i kapitel 11, inklusive alla anmärkningar.

Bisulfit-kitet ingår inte i ScreenYu Gyn® Kit. Bisulfit-behandling av prover måste utföras med EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD) (se kapitel 7 för referensinformation).

Provberedning

- ☐ Vortex patientproverna i 5 sekunder vid maximal hastighet och överför 1 ml till ett 1,5 ml reaktionsrör.
- ☐ Centrifugera proverna i 5 minuter vid 10 000 xg
- ☐ Avlägsna och kassera 900 µl av supernatanten ovanför pelleten.

Bisulfitbehandling av prover

- ☐ Förbered EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) enligt tillverkarens anvisningar
- ☐ Resuspendera pelleten
- ☐ Ställ in reaktionen i ett 0,5 ml reaktionsrör, vortexa och centrifugera

Reaktion för bisulfitomvandling

Komponent	Per reaktion
Lightning Conversion Reagent	130 µl
Resuspenderat prov	20 µl
Total volym	150 µl

- ☐ Utför bisulfitbehandlingen enligt tillverkarens anvisningar för EZ DNA Methylation-Lightning Kit och följ de ytterligare stegen:
- ☐ Kasta bort genomflödet efter det sista tvättsteget
- ☐ Centrifugera kolonnen i det tomma Collection Tube i 1 minut vid full hastighet för att torka den helt
- ☐ Överför kolonnen till ett 1,5 ml reaktionsrör
- ☐ Pipettera 15 µl M-Elution Buffer på kolonnen och centrifugera vid 8 000 xg i 30 sekunder

Förberedelse och pipettering av PCR

- ☐ Centrifugera provet
- ☐ Vortexa och centrifugera ScreenYu Gyn® Mastermix
- ☐ Ta bort PCR-locken från ScreenYu Gyn® Strips och kasta dem
- ☐ Pipettera 10 µl ScreenYu Gyn® Mastermix per rör
- ☐ Pipettera 10 µl prov eller ScreenYu Gyn® Positive Control (i brunn A1) eller ScreenYu Gyn® Water (i brunn B1)
- ☐ Stäng ScreenYu Gyn® Strips med oanvända ScreenYu Gyn® Caps (transparent påse)
- ☐ Vortexa och centrifugera ScreenYu Gyn® Strips

Utför PCR

- ☐ Slå på realtids-PCR-enheten, öppna programvaran om det behövs och välj *ScreenYu Gyn* Template
- ☐ Namnge PCR-körningen individuellt, redigera plattans layout, kontrollera temperaturprotokollet

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)	

- ☐ Placera ScreenYu Gyn® Strips och Balance Strips i enheten och starta PCR-körningen

Analys och tolkning av PCR-data

- ☐ Öppna den exporterade filen och slå samman data i ett lämpligt kalkylprogram
- ☐ Formatera data så att resultaten för de olika proverna visas under varandra och markörerna ZNF671 och ACTB visas bredvid varandra
- ☐ Kontrollera resultaten för den positiva kontrollen och den negativa kontrollen för båda markörerna
- ☐ Analysera resultatet för de insamlade proverna

Ett prov anses vara positivt i ScreenYu Gyn®-testet när följande kriterier är uppfyllda:

Giltighets- och positivitetskriterier

PCR-enhet	Markör	Ct-värde	$\Delta Ct_{ZNF671 - ACTB}$
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	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 10,00$

Ett positivt ScreenYu Gyn®-resultat är förknippat med förekomst av cervikal intraepitelial neoplasia eller livmoderhalscancer. ScreenYu Gyn® ska inte betraktas som det slutgiltiga terapeutiska beslutet och måste analyseras tillsammans med andra medicinska fynd.