



ScreenYu Gyn®

Alapvető UDI-DI: 426076785SCREENYUGYNP6

Használati utasítás



SG001-46

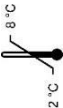


Legfeljebb 46 minta

UDI-DI

4260767852212

A teszt használata előtt kérjük, figyelmesen olvassa el ezt a használati utasítást, és kövesse annak utasításait a megbízható eredmények érdekében.



A ScreenYu Gyn® egy in vitro diagnosztikai készlet, amely egy humán epigenetikai marker kvalitatív kimutatására szolgál biszulfít-konvertált DNS-ben, olyan méhnyakminták esetén, amelyek HPV-pozitív eredményt mutattak vagy amelyeknél a Pap-teszt rendellenes eredménye további tisztázást igényel. A ScreenYu Gyn® pozitív eredménye összefüggésbe hozható a cervikális intraepiteliális neoplázia (CIN) vagy a méhnyakrák jelenlétével.

Kizárólag képzett személyzet által in vitro diagnosztikára (IVD) használható.

9-es felülvizsgálat (2026-02)

Fordítás kiadva 2026-02



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



A SZÁLLÍTÁS UTÁN AZONNAL TÁROLJA

A ScreenYu Gyn® Kit szobahőmérsékleten szállítják, és a hőmérsékleti tartomány megváltozásának ellenőrzéséhez a hőmérsékletmérő jelölés segítségével ellenőrizhető, hogy a validált hőmérsékleti tartományt nem lépték-e túl. A kézhezvétel után azonnal ellenőrizze a készlethez csatolt hőmérsékletmérő jelölést, és győződjön meg arról, hogy a színe megváltozott-e. Ellenőrizze a külső csomagolást, a pecsétet és az elsődleges csomagolást is, és győződjön meg arról, hogy azok nem sérültek-e. A készletet a kézhezvétel után azonnal 2 °C és 8 °C közötti hőmérsékleten hűtőszekrényben kell tárolni, és fénytől kell védeni. Megfelelő szállítás és tárolás esetén a ScreenYu Gyn® Kit és alkatrészei a feltüntetett dátumig használhatók.



A szállítási hőmérséklet ellenőrzése

A ScreenYu Gyn® Kithoz csatolt hőmérsékletmérő jelző a szállítás során figyeli a hőmérsékletet. A világos ezüst színű jelző azt jelzi, hogy a kitet a szállítási hőmérsékletnek megfelelően szállították. A fekete jelző azt bizonyítja, hogy a megadott szállítási hőmérsékletet nem tartották be, ami azt jelenti, hogy a ScreenYu Gyn® Kit teljesítményparaméterei már nem garantálhatók. Ebben az esetben kérjük, vegye fel a kapcsolatot az Epitype GmbH-val.

TARTALOMJEGYZÉK

1	Rendeltetés.....	4
2	Klinikai jelentősége	4
3	A teszt elve	4
4	ScreenYu Gyn® Assay Design	5
4.1	ScreenYu Gyn® Strips	5
4.2	Kontrollok	5
4.2.1	Minőség-ellenőrzés biszulfátkezelés (kontroll marker ACTB).....	5
4.2.2	Pozitív kontroll	5
4.2.3	Negatív kontroll	6
5	Referenciaanyag	6
6	A készlet tartalma	6
7	Fogyóeszközök és berendezések (nem tartoznak a készlethez)	7
8	Tárolás és eltarthatóság	8
9	Biztonsági utasítások	8
9.1	Általános információ	8
9.2	A helyiség elrendezése	9
9.3	A szennyeződés elkerülése	9
9.4	Kezelési utasítások	9
10	Megsemmisítés	10
11	ScreenYu Gyn® eljárás	11

11.1	Munkamenet	11
11.2	Mintavétel.....	11
11.3	Minta előkészítése	12
11.4	A minták biszulfátkezelése.....	12
11.5	PCR.....	13
11.5.1	A PCR előkészítése és pipettázása	13
11.5.2	A PCR- végrehajtása a cobas z 480 Analyzeron	14
11.5.3	A PCR elvégzése a CFX96 Real-Time PCR Detection Systems rendszeren	19
12	ScreenYu Gyn® teljesítmény.....	23
12.1	Analitikai teljesítmény	23
12.1.1	Analitikai érzékenység	23
12.1.2	Analitikai specifitás – nem metilált DNS kimutatása	24
12.2	Precizitás	25
12.2.1	Ismételhetőség	25
12.2.2	Reprodukálhatóság.....	25
12.3	Valódiság	25
12.4	Pontosság	25
12.5	Robusztusság.....	25
12.6	Cut-off érték	25
12.7	Klinikai teljesítményértékelés	26
13	Az eljárás korlátai.....	27
14	Hivatkozások	27
15	Felelősség	27
16	Kérdések és problémák.....	28
17	További megjegyzések	28
18	A szimbólumok jelentése	28
19	Változások listája	29
20	Rövid protokoll.....	29

1 RENDELTETÉS

A ScreenYu Gyn® egy in vitro diagnosztikai készlet, amely egy humán epigenetikai marker kvalitatív kimutatására szolgál biszulfít-konvertált DNS-ben, olyan méhnyakminták esetén, amelyek HPV-pozitív eredményt mutattak vagy amelyeknél a Pap-teszt rendellenes eredménye további tisztázást igényel. A ScreenYu Gyn® pozitív eredménye összefüggésbe hozható a cervikális intraepiteliális neoplázia (CIN) vagy a méhnyakrák jelenlétével.

ScreenYu Gyn® kizárólag molekuláris biológiai technikákban jártas, képzett laboratóriumi személyzet által használható. Az eredmények értelmezését mindig további laboratóriumi diagnosztikai eljárások eredményeivel együtt, valamint a klinikai kép figyelembevételével kell elvégezni.

2 KLINIKAI JELENTŐSÉGE

A méhnyakrák a negyedik leggyakoribb rákos megbetegedés a nők körében világszerte, évente több mint 600 000 új esetet regisztrálnak [1]. Szinte minden esetben a rákkeltő humán papillomavírus (HPV) tartós fertőzése az alapvető ok [2] és a méhnyakrák kialakulásának előfeltétele. A HPV-negatív nőknél rendkívül alacsony a méhnyakrák kialakulásának kockázata, de még a HPV-fertőzött nők többségénél sem alakul ki rákot megelőző állapot. A HPV-fertőzött nőknek csak körülbelül 15%-ánál alakul ki ténylegesen rákot megelőző állapot vagy kezelést igénylő karcinóma [3].

A HPV-teszt eredménye pozitív és/vagy a Pap-eredmény tisztázásra váró (Pap II, Pap III és Pap IIID₁ és D₂) betegeknek ezért ajánlott egy triázs teszt, például a ScreenYu Gyn® használata, hogy nagy pontossággal meg lehessen állapítani a rák vagy annak előfutára jelenlétének valószínűségét.

A ScreenYu Gyn® nem tekinthető végleges terápiás döntésnek, és más orvosi eredményekkel együtt kell elemezni.

3 A TESZT ELVE

ScreenYu Gyn® egy epigenetikus biomarkerek, azaz egy specifikus DNS-szakasz metilációjának kimutatásán alapul, amelynek jelenléte rákmegelőző elváltozások vagy méhnyakrák jelenlétével áll összefüggésben [4, 5, 6]. Ezenkívül egy biszulfát-specifikus referenciamarkert is elemeznek. A használt marker régiókat az alábbi táblázat mutatja be.

A marker régiók áttekintése

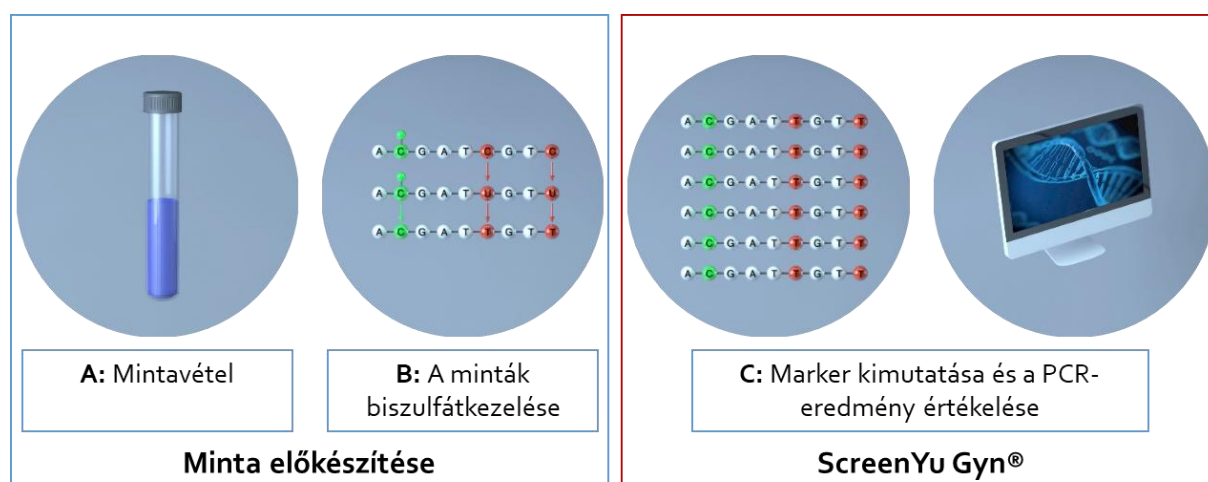
Megjelölés a protokollban	Marker régió (gén megjelölés)	Fluoreszkáló festék
Metilációs marker	ZNF671	ROX
Kontroll marker	ACTB	FAM

A kimutatás rendkívül érzékeny, próbaalapú valós idejű PCR módszerrel történik. A valós idejű műszerek kimenete a Cp érték (keresztkezőpont, cobas z 480 Analyzer) vagy a Cq érték (ciklus kvantifikáció, CFX96 Real-Time PCR Detection Systems), amelyek mindegyike megfelel a ciklusküszöb Ct értéknek, és az alábbiakban is így hivatkozunk rájuk. Ez az érték megfelel annak a ciklusnak a valós idejű PCR-ben, amelyben a fluoreszcencia először emelkedik egy meghatározott küszöbérték fölé.

A ScreenYu Gyn® segítségével végzett betegminta-elemzés két lépésből áll.

Először a méhnyakkenetből származó DNS-t biszulfittal átalakítják, és a metilációt rögzítik. A második lépésben az eluált, biszulfittal kezelt DNS-t metiláció-specifikus, próbaalapú Real-Time PCR-rel elemzik. Az eredetileg metilált DNS-szakaszt a ScreenYu Gyn® Strips primerekkel szelektíven amplifikálják. A metiláció és a kontrollmarker kimutatását fluoreszkáló festékekkel jelölt -szondákkal végzik. Ezenkívül a PCR megerősítésére pozitív és negatív kontroll is szerepel. Ezt követően elvégzik a vizsgálatspecifikus elemzést.

A mintavételi és a biszulfát-készlet nem része a ScreenYu Gyn® Kitnek. A mintavételhez és a biszulfát-kezeléshez kifejezetten tervezett termékek külön kaphatók.



A teszt elve

A: A nőgyógyász megfelelő mintavételi készlettel kenetet vesz a páciens méhnyakából.

B: A diagnosztikai laboratórium biszulfátkezelést végez a beteg mintáján.

C: Mintánként egy duplex-PCR reakciót hajtanak végre. Az elemzést a ScreenYu Gyn® Strip-ben található festékkel jelölt próbák kimutatásával végzik.

4 SCREENYU GYN® ASSAY DESIGN

4.1 ScreenYu Gyn® Strips

A ScreenYu Gyn® egy TaqMan próba alapú teszt. A ScreenYu Gyn® Strip egy 8 üreges PCR-csík, amely minden üregben két primerpárt, valamint a metiláció-specifikus ZNF671 marker és az ACTB kontroll marker amplifikálásához szükséges próbát tartalmaz. A beteg mintájának elemzéséhez egy ScreenYu Gyn® Strip egyik ürege szükséges.

4.2 Kontrolllok

A ScreenYu Gyn® Kit kialakítása három kontrollt tartalmaz a minta minőségének és a biszulfátkezelésnek (ACTB marker), valamint a PCR-reakció minőségének (pozitív kontroll és negatív kontroll) ellenőrzésére.

4.2.1 Minőség-ellenőrzés biszulfátkezelés (kontroll marker ACTB)

Ez a kontroll marker ellenőrzi az összes nem metilált citozin uracilra történő sikeres átalakulását, és így a végzett biszulfátkezelés minőségét. A detektálás a humán béta-aktin (ACTB) génhez közeli DNS-fragmentum amplifikációjával történik. Ha nincs ACTB amplifikáció 32 alatti Ct értékkel, a minta vizsgálatát érvénytelennek tekintik, és meg kell ismételni.

4.2.2 Pozitív kontroll

A pozitív kontroll a PCR minőségét ellenőrzi. A ScreenYu Gyn® Positive Control (PC) amplifikációjának mind a metilációs marker, mind a kontroll marker esetében 38 alatti Ct értéket kell eredményeznie. Ellenkező esetben a PCR érvénytelen, és meg kell ismételni.

4.2.3 Negatív kontroll

A negatív kontroll egy kontrollreakció ScreenYu Gyn® Water (NTC – No Template Control) sablonnal, amelynek mindkét markernél negatívnak kell lennie. Ha a negatív kontrollban Ct értékek jelennek meg, akkor nagy valószínűséggel szennyeződés történt, és a ScreenYu Gyn® vizsgálatot meg kell ismételni.

5 REFERENCIAANYAG

Nem áll rendelkezésre nemzetközi referenciaanyag.

6 A KÉSZLET TARTALMA

ScreenYu Gyn® Kit tartalma

Az alkatrészek megnevezése	Szimbólum	Tartalom	Térfogat/mennyiség SG001-46
ScreenYu Gyn® Mastermix	PCR-MM	PCR Mastermix ¹ (2x)	1 x 0,55 ml
ScreenYu Gyn® Strips	STRIPS	PCR csík ²	6 csík
ScreenYu Gyn® Caps	CAPS	Szalagokhoz való kupak	6 kupak
ScreenYu Gyn® Positive Control	CONTROL+	Pozitív kontroll	1 x 90 µl
ScreenYu Gyn® Water	H₂O	Víz	1 x 2 ml
Használati utasítás	-	Használati utasítás	1

¹ Tartalmazza a polimeráz láncreakcióhoz (PCR) szükséges összes komponenst, kivéve a primereket, a próbákat és a sablont.

² Tartalmazza a PCR-hez szükséges primereket és próbákat.

7 FOGYÓESZKÖZÖK ÉS BERENDEZÉSEK (NEM TARTOZNAK A KÉSZLETHEZ)

ScreenYu Gyn® kizárólag a felsorolt fogyóeszközökkel és berendezésekkel együtt, és csak képzett személyzet által használható. Az összes szükséges laboratóriumi berendezést a gyártó utasításainak megfelelően kell felszerelni, kalibrálni, kezelni és karbantartani.

A szobahőmérséklet 15 °C és 30 °C között van.

Szükséges berendezések

Berendezés	Katalógusszám	Gyártó
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® vagy Cervex-Brush® Combi	-	Rovers Medical Devices

* PCR-ben Balance Strips-ként való felhasználáshoz lásd a lemez elrendezését a 15 vagy a 19 oldalon.

A ScreenYu Gyn® teszt elvégzéséhez a következő laboratóriumi berendezések és fogyóeszközök szükségesek.

- 0,5 ml/1,5 ml reakciócsövekhez való centrifuga, $\geq 10\ 000\ \times g$
- Centrifuga PCR csíkokhoz
- Termocikler 0,5 ml-es reakciócsövekhez
- Vortex keverő/rázógép
- Különböző térfogatú pipetták és hozzájuk tartozó szűrőhegyek (steril, DNáz-mentes)
- Reakciócső állvány 0,5 ml/1,5 ml/2 ml reakciócsövekhez
- 96-lyukú állvány PCR-csíkokhoz
- Reakciócsövek 0,5 ml/1,5 ml-es (DNáz-mentes)
- Etanol 96–100%, nem denaturált
- Valós idejű PCR-készülék, detektáló csatornák FAM és ROX próba festékekhez

A ScreenYu Gyn® a következő valós idejű PCR-készülékeken lett validálva:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) 96-lyukú blokkal, adapterrel PCR csíkokhoz és LightCycler® 480 Software UDF 2.0.0 (Service Pack 3) szoftverrel, értékelés 1.5.1.62 verzióval
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) CFX Maestro Software 2.3 verzióval

8 TÁROLÁS ÉS ELTARTHATÓSÁG

Megfelelő szállítás és tárolás esetén a ScreenYu Gyn® Kit és összetevői a feltüntetett dátumig használhatók. A készletben található összes reagens a feltüntetett lejárati időig stabil, ha a feltüntetett feltételek mellett tárolják és védik a szennyeződésektől.

A ScreenYu Gyn® Kit és a készletben nem szereplő berendezések tárolási hőmérséklete

Berendezések	Tárolási hőmérséklet
ScreenYu Gyn® Kit	2 °C és 8 °C között
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE IVD)	15 °C és 30 °C között
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C és 30 °C között
Cervex-Brush® vagy Cervex-Brush® Combi	15 °C és 30 °C között

9 BIZTONSÁGI UTASÍTÁSOK

9.1 Általános információ

A legkorszerűbb molekuláris biológiai módszerek alkalmazásakor az alábbi utasításokat szigorúan be kell tartani a laboratóriumi személyzet maximális biztonsága és a kiváló minőségű eredmények elérése érdekében:

- Mivel molekuláris biológiai folyamatokat, például biszulfátkezelést, amplifikációt és DNS-detektálást tartalmaz, ez a készlet kizárólag in vitro diagnosztikára szolgál, és csak olyan személyzet használhatja, aki képzett az in vitro diagnosztikai laboratóriumi gyakorlatokban.
- A termék használata előtt olvassa el figyelmesen a használati utasítást. Csak a jelenlegi verziót vegye figyelembe.
- Minden lépésnél viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, eldobható kesztyűt és, ha szükséges, védőszemüveget.
- Kerülje a biológiai mintákkal való közvetlen érintkezést, valamint a minták fröccsenését vagy aeroszolképződését.
- A termocikler fűtött fedele és inkubációs blokkja akár 110 °C-os hőmérsékletet is elérhet. Égési sérülés veszélye áll fenn. Kérjük, tartsa be a készülék használati utasítását.
- A minták és reagensok kezelése után alaposan mossa meg a kezét.
- Ne használja a ScreenYu Gyn® terméket, ha a reagens csomagolása sérült. Forduljon forgalmazójához.
- Ne használja a ScreenYu Gyn® Kit a lejárati idő után, és ne használjon lejárt reagenset.
- Ne keverje össze különböző tételekből származó reagenset, és ne keverje össze a készlet reagensait más gyártók reagensével.
- Csak a készletben található vagy a gyártó által ajánlott anyagokat használja.
- Az összes szükséges laboratóriumi berendezést a gyártó utasításainak megfelelően kell felszerelni, kalibrálni, kezelni és karbantartani.
- A mikroliter tartományba eső kis mennyiségű folyadék pipettázása gyakorlást igényel. Győződjön meg arról, hogy a mikropipettákkal a szükséges mennyiségeket a lehető legpontosabban pipettázza.
- A kezelőnek be kell tartania az alkalmazandó szabályozási követelményeket.

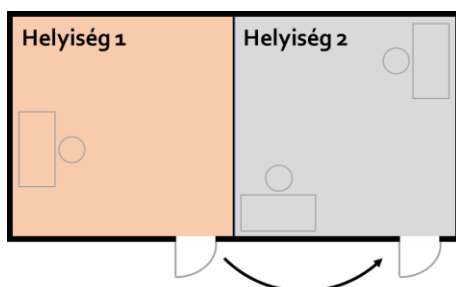
- Feltételezzük a jó laboratóriumi gyakorlat (GLP) betartását, amelyet például az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) vagy a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (OECD) határozott meg. Különösen figyelembe kell venni a molekuláris amplifikációs vizsgálatok elvégzésére vonatkozó ajánlásokat.
- A PCR-készülékek megfelelő működése csak szobahőmérsékleten garantált.

9.2 A helyiség elrendezése

A PCR magas analitikai érzékenysége miatt különös figyelmet kell fordítani a készlet összetevőinek és a minták tisztaságának megőrzésére.

A PCR a mintában található DNS szakaszokat milliószer, milliárdszor szaporítja. A PCR-termékek legkisebb mennyiségei (pl. aeroszol formájában is) is hamis eredményhez vezethetnek, ha átkerülnek a mintába, a biszulfátkezeléshez használt reagensekbe vagy a készlet PCR-reagenseibe.

A helytelen eredmények elkerülése érdekében ezért elengedhetetlen a tiszta és jól strukturált munkafolyamat. Ehhez szükséges a pre-PCR és a post-PCR laboratóriumi területek egymástól való elválasztása. Mindkét területen külön felszerelések, fogyóeszközök, laboratóriumi köpenyek és kesztyűk kell, hogy rendelkezésre álljanak. Soha ne vigyen át laboratóriumi köpenyeket, kesztyűket vagy felszereléseket az egyik területről a másikra. Az alábbi ábra egy két különálló helyiségre osztott laboratórium példáját mutatja. Az egyik területet kizárólag a biszulfátkezelés és a PCR előkészítése számára jelölték ki, míg a másik területen a PCR-t végzik.



Térbeli elválasztás

A minták biszulfátkezelését, valamint a teljes PCR-előkészítést az 1. helyiségben végzik (optimális esetben PCR-szekrény használatával). A 2. helyiségben végzik el, detektálják és elemzik a PCR-t.

9.3 A szennyeződés elkerülése

- Minden lépés során laboratóriumi köpenyt és eldobható kesztyűt kell viselni.
- Az eldobható kesztyűket gyakran, és mindig a reagensekkel vagy mintákkal való (gyanított) szennyeződés után cserélni kell.
- Minden felületet, berendezést és kelléket megfelelő tisztítószerrel (DNS-megsemmisítő szerekkel) kell fertőtleníteni.
- Ne érintse meg a reakciócsövek belsejét vagy azok kupakjait.
- Pipettázáskor mindig szűrőhegyeket (DNáz-, RNáz- és emberi DNS-menteseket) kell használni, hogy kizárható legyen a pipettázás során keletkező aeroszolok általi keresztszennyeződés. A hegyeket pipettázási lépések között mindig cserélni kell.
- Fontos negatív kontrollokat végezni az esetleges szennyeződés kimutatására.

9.4 Kezelési utasítások

- A fel nem használt komponenseket a felhasználásig az eredeti csomagolásukban tárolja.
- Minden centrifugálási lépést szobahőmérsékleten kell végrehajtani.

- A munkafolyamat a biszulfátkezelés után megszakítható. Ekkor a minták 2 °C és 8 °C között egy hétig, vagy –15 °C és –30 °C között legfeljebb két hónapig tárolhatók.
- A ScreenYu Gyn® Strips és a ScreenYu Gyn® Caps termékeket az egész eljárás során nem szabad érintkezésbe hozni eldobható kesztyű nélkül, ellenkező esetben nem specifikus fluoreszcencia jelek léphetnek fel.
- A ScreenYu Gyn® Strips és a ScreenYu Gyn® Caps egyszer használatosak, újra nem használhatók.
- A fel nem használt ScreenYu Gyn® Strips és ScreenYu Gyn® Caps az eredeti csomagolásukban tárolja. A ScreenYu Gyn® Strips feltétlenül fénytől elzárva tárolja.

10 MEGSEMMISÍTÉS

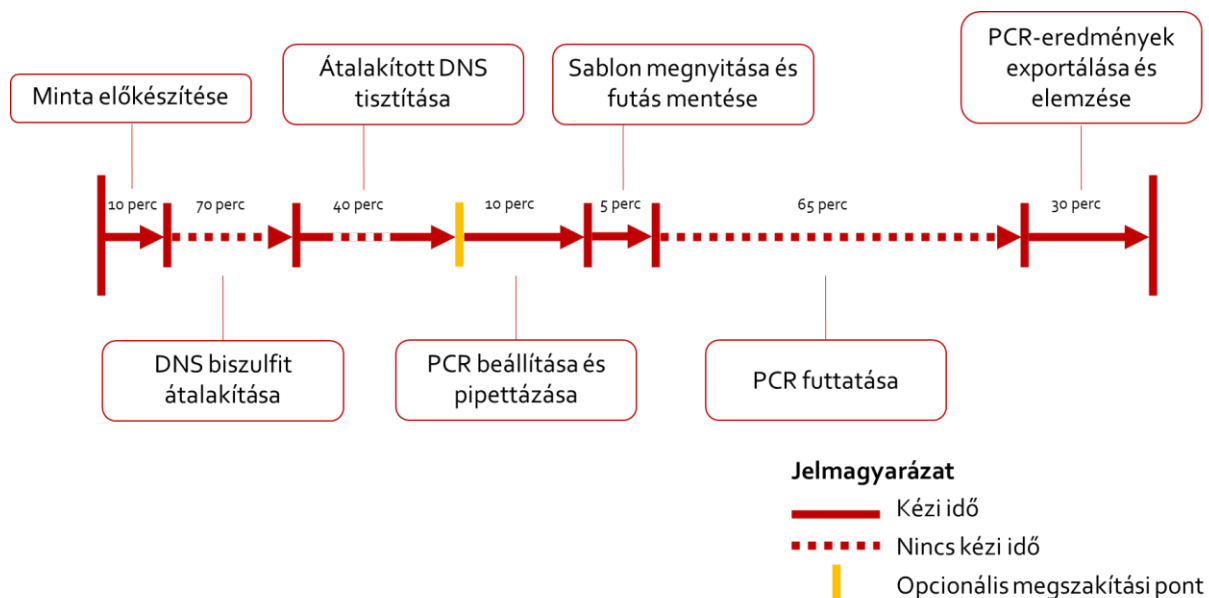
A fel nem használt ScreenYu Gyn® Kit és alkatrészei további különleges óvintézkedések nélkül ártalmatlaníthatók. A betegmintákat és a használt reakciócsöveket fertőző hulladékként kell kezelni. Minden reagenst a jogszabályi előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

11 SCREENYU GYN® ELJÁRÁS

A következő fejezet részletesen leírja a mintavételtől az adatelemzésig tartó különböző lépéseket.

11.1 Munkamenet

A ScreenYu Gyn® eljárás összesen kevesebb mint négy óra alatt elvégezhető. Az aktív munkaidő körülbelül 2 óra. Az első ScreenYu Gyn® eljárás során 15 percet kell szánni a PCR-sablon elkészítésére.



A ScreenYu Gyn® munkafolyamat idővonal

11.2 Mintavétel

A mintavételi készlet nem része a ScreenYu Gyn® Kitnek. A ThinPrep® PreservCyt® fiolák (Hologic, Inc.) és a Cervex-Brush® mintavételi eszközök (Rovers Medical Devices) a gyártóktól rendelhetők. A méhnyakmintát az orvosnak a gyártó utasításainak megfelelően és a méhnyakkenet mintavételére vonatkozó általánosan elfogadott irányelveknek megfelelően kell venni [7].

Fontos: A mintavételi eszköz kefe feje a mintavétel után nem maradhat a mintatartóban, mert ez rontja a ScreenYu Gyn® teljesítményét.

A kenet közegként ThinPrep® PreservCyt® Solutionot kell használni. Más mintavételi közegek használata nem volt része a ScreenYu Gyn® teszt validálásának.

A vizsgálat érvényességének fontos előfeltétele a felhasznált DNS-minta jó minősége. A nem megfelelő mintavétel, biszulfátkezelés és DNS-tárolás érvénytelen vagy akár hamis negatív eredményekhez vezethet.

A méhnyakminták hűtés nélkül szállíthatók a laboratóriumba vizsgálatra. A minták 2 °C és 30 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 1,5 évig tárolhatók.

11.3 Minta előkészítése

A következő lépéseket a mintaelőkészítési területen (1. szoba) kell elvégezni.

Fontos: Ha a tampon gyűjtőkefének kefeje a mintatartó fiolában van, azt először el kell távolítani és meg kell semmisíteni.

- Az összes betegmintát 5 másodpercig maximális sebességgel keverje össze, majd azonnal 1 ml közeget vigyen át egy 1,5 ml-es reakciócsőbe.

Figyelem: A sejtek nagyon gyorsan leülepsznek a cső aljára. A betegminták keverése és az 1 ml-es minta kivétele között nem telhet el több mint 10 másodperc!

- Centrifugálja a mintákat **5 percig 10 000 xg** sebességgel.
- Óvatosan távolítsa el a pellet feletti 900 µl felülúszót anélkül, hogy a pelletet megsértené.

Figyelem: A minta jellegétől függően a pellet többé-kevésbé szilárd.

- A pelletet 3 másodpercig vortexeléssel reszuszpendálja. Adjon 20 µl reszuszpendált mintát a biszulfátkezeléshez. A maradék 80 µl-t dobja ki.

11.4 A minták biszulfátkezelése

A biszulfid készlet nem része a ScreenYu Gyn® Kit-nek. A ScreenYu Gyn®-t az EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) segítségével validálták.

- **Bemenet:** Adjon **20 µl reszuszpendált mintát + 130 µl Lightning Conversion Reagent-et** egy 0,5 ml-es reakciócsőbe.
- Végezze el a biszulfátkezelést az EZ DNA Methylation-Lightning Kit gyártójának utasításai szerint, a következő módosításokkal:

- Az utolsó mosási lépés után öntse ki az átfolyó folyadékot.
- Centrifugálja az oszlopot az üres Collection-Tube-ben **1 percig teljes sebességgel**, hogy teljesen megszáradjon.

Figyelem: Ne hagyja ki ezt a lépést, mivel a maradék etanol ronthatja a ScreenYu Gyn® assay teljesítményét.

- Eluálja **15 µl M-Elution Buffer-ben 30 másodpercig 8000 xg-vel**.

11.5 PCR

A PCR megkezdése előtt győződjön meg arról, hogy a PCR hőmérsékleti protokoll be van programozva a megfelelő valós idejű PCR készülékbe, hogy minimálisra csökkenjen az előkészítés és a PCR megkezdése közötti idő. A PCR program beállítása a cobas z 480 Analyzer az 14. oldalon leírtak szerint történik. A CFX96 Real-Time PCR Detection Systems végzett PCR leírása a 19. oldalon található.

11.5.1 A PCR előkészítése és pipettázása

Fontos: A PCR előkészítése és pipettázása nem tarthat tovább 60 percnél. Ezt a lépést az 1. helyiségben (pre-PCR terület) kell elvégezni.

Kérjük, vegye figyelembe a 15. vagy a 19. oldalon leírt lemez elrendezést. A pozitív kontrollt (PC) az A1 üregbe, a negatív kontrollt (NTC) pedig a B1 üregbe kell pipettázni.

- Vegye ki a **ScreenYu Gyn® Mastermix-et** és a szükséges számú **ScreenYu Gyn® Strips** a készletből, és helyezze őket egy 96 üreges állványra.

Figyelem: Egy **ScreenYu Gyn® Strip** nyolc PCR-vizsgálatra elegendő. Felhívjuk figyelmét, hogy minden PCR-futáshoz pozitív kontrollt és negatív kontrollt (víz, NTC) kell elvégezni.

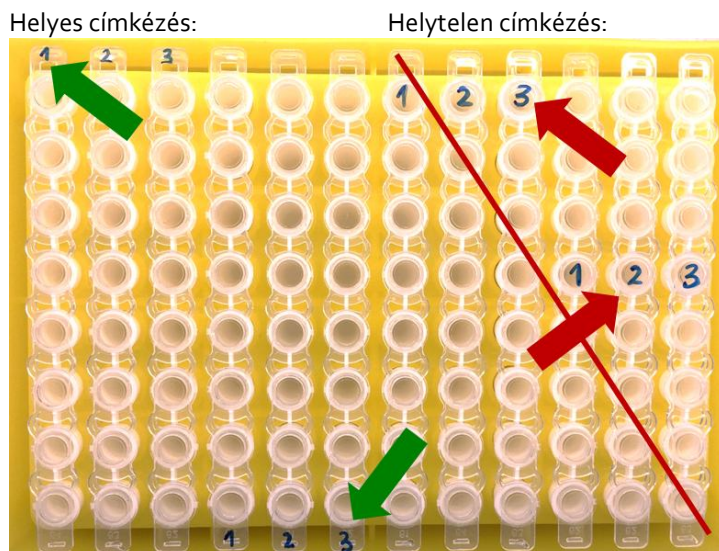
- A **ScreenYu Gyn® Mastermix-et** 3 másodpercig maximális sebességgel keverje, majd centrifugálja le.
- Vegye le a **PCR-sapkát** a **ScreenYu Gyn® Strips**-ről, és **dobja** ki.
- Adjon **10 µl ScreenYu Gyn® Mastermix-et** a **ScreenYu Gyn® Strip** minden üregébe.
- A mintát 3 másodpercig maximális sebességgel keverje vortexen, majd centrifugálja rövid ideig.
- Adjon **10 µl mintát** a **ScreenYu Gyn® Mastermix**-szel töltött üregbe.

Fontos: Minden pipettázási lépésnél cserélje ki a pipetta hegyét.

Megjegyzés: A többi minta eluátumot őrizze meg a **ScreenYu Gyn® PCR** ismétléséhez, ha szükséges.

- A **ScreenYu Gyn® Positive Control-t** 3 másodpercig maximális sebességgel keverje vortexen, majd centrifugálja le.
- Adjon **10 µl ScreenYu Gyn® Positive Control-t** az A1 üregbe és **10 µl ScreenYu Gyn® Water-t** a B1 üregbe negatív kontrollként.
- Zárja le minden **ScreenYu Gyn® Strip-et** egy használatlan **ScreenYu Gyn® Cap**-kal (átlátszó tasak).

Figyelem: Ne érintse meg a **ScreenYu Gyn® Strips** és a **ScreenYu Gyn® Caps** belsejét. Győződjön meg arról, hogy a **ScreenYu Gyn® Cap** megfelelően illeszkedik a **ScreenYu Gyn® Strip-re** a lezárás után. A ellenőrzést leginkább oldalról történő vizuális ellenőrzéssel lehet elvégezni.



Figyelem:

Ne címkézze a kupakok azon részét, amely közvetlenül a lyukak felett van, mivel a PCR-jelet felülről olvassa le a kupakokon keresztül, és ez helytelen fluoreszcencia-jelekhez vezetne.

A kupak tetején és alján található nagy retesz használható címkézésre.

- Zárja be az összes **ScreenYu Gyn® Strips**, és keverje 3 másodpercig maximális sebességgel, majd centrifugálja le.

11.5.2 A PCR- végrehajtása a cobas z 480 Analyzeron

A következő szakaszban ismertetjük, hogyan kell elvégezni a ScreenYu Gyn®-t a cobas z 480 Analyzer (kékkel jelölve) és a CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (zölddel jelölve) valós idejű PCR rendszereken. Mindig kövesse a gyártó utasításait a PCR-eszközök működtetésével kapcsolatban.

A PCR-t a 2. helyiségben kell elvégezni.

11.5.2.1 PCR-sablon létrehozása

Ha korábban létrehozta és elmentette a PCR-sablont, folytathatja a 11.5.2.2 A PCR futtatás elindítása.

- Kapcsolja be a cobas z 480 Analyzer készüléket és a számítógépét. 15 másodpercen belül válassza a „User defined Workflow” lehetőséget a számítógép BIOS képernyőjén, hogy átváltson egy szabadon programozható készülékmódra.
- Nyissa meg a szoftvert, és jelentkezzen be.
- Válassza a „Tools”  menüpontot a jobb oldali műveletsávon, majd hozzon létre egy új *Detection Format* elemet. Nevezze el *ScreenYu Gyn®*. Válassza ki a 465-510 és 540-610 (gerjesztés-emisszió) szűrő kombinációt. Zárja be az ablakot a *Close* gombra kattintva.
- Válassza az *New Experiment* egy új sablon létrehozásához.
A *Run Protocol* fülön állítsa be a *Detection Format* értéket *ScreenYu Gyn*, és állítsa be a *Reaction Volume* értéket 20 µl-re. Programozza be a hőmérsékleti protokollt az alábbi táblázat szerint.

PCR hőmérsékleti protokoll a cobas z 480 Analyzeron

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

- Mentse el a futási sablont *ScreenYu Gyn* néven az *Apply Template* → és *Save as Template* opciók kiválasztásával, majd a sablont a kívánt helyre mentse.

11.5.2.2 A PCR futtatás elindítása

Ha korábban elmentette a PCR sablont, akkor most a *New Experiment from Template* → *ScreenYu Gyn* gombra kattintva érheti el. Ellenőrizze, hogy a megfelelő hőmérsékleti protokoll van-e beállítva.

- A lemez elrendezésétől függően válasszon egy *Subset Template* az *Subset Editor*. Ehhez nyomja meg a „+” gombot, válassza ki az elrendezésben az összes elfoglalt üreget, majd erősítse meg a sablont az *Apply* gombbal. Ez az *Subset Template* a kívánt helyre menthető a *Apply Template* → *Save as Template*.
- Válasszon ki egy megfelelő lemez elrendezést:

	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											

Példa 6 betegmintára (1 – 6) vonatkozó lemez elrendezésre

A nem teljesen kitöltött lemez elemzése a *Subset Editor* meghatározott alcsoportjával történik.

	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						

Példa 46 betegmintára (1–46) vonatkozó lemez elrendezésre

A nem teljesen kitöltött lemez elemzése a *Subset Editor* meghatározott alcsoportjával történik.

Fontos: A lemez elrendezése nem változtatható. A pozitív kontrollt (PC) az A1 üregbe, a negatív kontrollt (NTC) pedig a B1 üregbe kell helyezni.

Az üres pozíciókat üres csíkokkal (Balance Strips) kell kitölteni az egyensúlyozás érdekében, lásd a 7 fejezetet.

- A minta címkézését a *Sample Editor* lehet megadni úgy, hogy a 2. lépésben: *Select Samples* → *Subset* kiválaszt egy meghatározott alcsoport sablont, majd a 3. lépésben: *Edit Properties* beírja a *Sample Name*. Ez a minta sablon a kívánt helyre menthető az *Apply Template* → *Save as Template* menüponttal.
- Helyezze a csíkokat függőlegesen a PCR-készülékbe a meghatározott sorrendben.
Fontos: Használja a PCR csíkokhoz való adaptert (Roche Diagnostics GmbH).
- A „floppy disk” gomb (az akciósáv jobb oldalán) megnyomásával mentse a PCR futást egyedi névvel a kívánt mappába, majd a *Run Protocol (Experiment Editor)* fülön található *Start Run* gombra kattintva indítsa el a PCR futást.

11.5.2.3 Az adatok exportálása

Ha a PCR futást közvetlenül a cobas z 480 Analyzer számítógépen elemzi, folytassa a 11.5.2.4 A PCR-adatok elemzése.

- A PCR befejezése után (*Run complete*) exportálja a PCR futást az  menüpont „Export” opciójával, és mentse a fájlt a kívánt helyre.

11.5.2.4 A PCR-adatok elemzése

Az alábbiakban az exportált adatok elemzését ismertetjük. Ezek az utasítások a Microsoft Excel táblázatkezelő programmal készültek. Más megfelelő programok használata is lehetséges.

- Ha exportálta a PCR futást, indítsa el a LightCycler® 480 szoftvert egy másik számítógépen, és nyissa meg/importálja a PCR futást. Ellenkező esetben végezze el az elemzést a cobas z 480 Analyzer számítógépén.
- Az *Analysis* menüpontban válassza ki az *Abs Quant/Fit Points* elemzési algoritmust és szükség esetén a megadott alcsoportot.
- A *Cycle Range* fülön állítsa be a következő paramétereket: *First Cycle* 1, *Last Cycle* 42 és a *Background* 5-20, a *Min Offset* értéket 4-re, a *Max Offset* értéket pedig 19-re állítva.
- A *Noise Band* fülön ellenőrizze, hogy az *STD Multiplier* értéke 12-re van-e állítva, és a *Noise Band* automatikusan kiszámításra kerül-e.
- Két különböző fluoreszkáló festék detektálása miatt a PCR-adatok elemzése minden marker esetében külön történik. A megfelelő detektáló csatorna a *Filter Comb* gombbal választható ki:

Szűrő kombinációk és küszöbérték beállítások a cobas z 480 Analyzer

Marker	Detektáló csatorna	Szonda	Threshold
ACTB	465 – 510	FAM	1,2
ZNF671	540 – 610	ROX	0,5

- Az *Analysis* fülön ellenőrizze, hogy a *Fit Points* száma 2-re van-e állítva.
- Az **ACTB** esetében válassza a *Filter Comb 465 - 510* lehetőséget, állítsa a *Threshold 1,2-re*, majd nyomja meg a *Calculate* gombot az elemzés elvégzéséhez. Exportálja az adattáblázatot .txt fájlként a *Samples* alatt található *Export Table* gombra kattintva, majd mentse el egy megfelelő helyre egyedi névvel.
- Ezután a **ZNF671** esetében válassza a *Filter Comb 540 - 610* lehetőséget, állítsa a *Threshold 0,5-re*, majd nyomja meg a *Calculate* gombot az elemzés elvégzéséhez. Exportálja az

adattáblázatot .txt fájlként a *Samples* alatt található *Export Table* jobb gombbal, majd mentse el egy megfelelő helyre egyedi névvel.

Figyelem: Mindig a leírtak szerint, egymás után elemezze a két markert, mivel a program minden szűrőre mindig a manuálisan beállított küszöbértékeket alkalmazza.

- Nyissa meg egy táblázatkezelő programot, például a Microsoft Excel-t, és másolja be mindkét .txt fájl összes adatait, mind a ZNF671 markert (Selected Filter: 540-610), mind az ACTB markert (Selected Filter: 465-510) tartalmazókat.
- Formázza az adatokat úgy, hogy a különböző minták eredményei egymás alatt, a ZNF671 és ACTB markerek pedig egymás mellett jelenjenek meg.

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

A PCR futtatás érvényességének ellenőrzése

A PCR futtatás akkor érvényes, ha a pozitív és negatív kontrollok megfelelnek a következő kritériumoknak:

A ScreenYu Gyn® kontrollok érvényességi kritériumai

Marker	Cp érték pozitív kontrollhoz	Cp érték negatív kontrollhoz
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	nincs érték
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	nincs érték

A minták érvényességének ellenőrzése

A betegmintának akkor érvényes az eredménye, ha az ACTB kontrollmarker megfelel a következő kritériumnak:

A betegminták érvényességi kritériumai

Marker	Cp érték a betegmintára
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

A ScreenYu Gyn® teszt elemzése

Ha a metilációs marker ZNF671

- nem ad Cp értéket, a **ScreenYu Gyn® eredménye negatívnak** minősül.
- Cp értéket ad $> 0; < 20$, akkor a **ScreenYu Gyn® eredménye** erre a mintára **érvénytelennek** minősül.
- Cp értéket ad $\geq 20; \leq 42$, a ΔCp -t a következő egyenlet szerint számolják ki:

A ΔC_p kiszámítása

$$\Delta C_p = C_{p_{ZNF671}} - C_{p_{ACTB}}$$

Ha $\Delta C_p \leq 9,00$, akkor a ScreenYu Gyn® eredménye pozitívnak minősül.

Ha $\Delta C_p > 9,00$, akkor a ScreenYu Gyn® eredménye negatívnak minősül.

A pozitív ScreenYu Gyn® eredmény méhnyak intraepiteliális neoplázia vagy méhnyakrák jelenlétével társul. A ScreenYu Gyn® nem tekinthető végleges terápiás döntésnek, és más orvosi eredményekkel együtt kell elemezni.

11.5.3 A PCR elvégzése a CFX96 Real-Time PCR Detection Systems rendszeren

11.5.3.1 PCR-sablon létrehozása

- Kapcsolja be a PCR-készüléket.
- Programozza be a PCR hőmérsékleti protokollt az alábbi táblázatban leírtak szerint, kiválasztva és szerkesztve a hőmérsékleti lépéseket és időket.

PCR hőmérsékleti protokoll** a CFX96 Real-Time PCR Detection Systems

Programme Name	Step	Number of cycles	Temperature	Time (m:ss)
Initialization	1	1 x	94 °C	1:00
Amplification	2	42 x	94 °C	0:15
	3*		61 °C	0:30
	4		GO TO Step 2	41 x
Cooling	5	1 x	30 °C	1:00

* A fluoreszcencia jelét a 3. lépés során a „Plate Read” funkcióval érzékelik, amelyet a kamera szimbólum jelöl.

** A CFX96 Real-Time PCR Detection Systems alapértelmezett hőmérséklet-emelkedési sebessége 5 °C/másodperc. Ez a beállítás került felhasználásra az IVD teszt validálásához.

- Állítsa be a reakció térfogatát 20 µl-re, a fedélfűtő hőmérsékletét pedig 105 °C-ra.
- Mentse el a PCR-sablont *ScreenYu Gyn* néven.

11.5.3.2 A PCR futtatásának megkezdése

Ha korábban elmentette a PCR-sablont, most már elérhető és megnyitható. Ellenőrizze, hogy a megfelelő hőmérsékleti protokoll van-e beállítva.

- Helyezze a **ScreenYu Gyn® Strips** a PCR-készülékbe úgy, hogy azokat függőlegesen behelyezi a fűtőblokk kis üregeibe. Válassza ki a megfelelő lemez elrendezést.

	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											

Példa 6 betegmintára (1–6) vonatkozó lemez elrendezésre

	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						

Példa 46 betegmintára (1–46) vonatkozó lemez elrendezésre

Fontos: A lemez elrendezése nem változtatható. A pozitív kontrollt (PC) az A1 üregbe, a negatív kontrollt (NTC) pedig a B1 üregbe kell helyezni.

Az üres pozíciókat üres csíkokkal (Balance Strips) kell kitölteni az egyensúlyozás érdekében, lásd a 7 fejezetet.

- Nevezze el a futtatást egy megfelelő fájlnevvvel. Vegye figyelembe, hogy a futtatás megkezdése előtt az *All Channels* felismerésre kerül.

11.5.3.3 Az adatok exportálása

- A PCR befejezése után exportálja a PCR futást (.pcrd fájl).

11.5.3.4 A PCR-adatok elemzése

Az alábbiakban az exportált adatok elemzését ismertetjük.

- Nyissa meg a számítógépen a BioRad CFX szoftvert, és először állítsa be a *Plate Type: BR White* beállítást a *User → User Preferences → Plate* menüpontban, jelezve, hogy fehér műanyagot használ.
- Importálja a .pcrd fájlt.
- Határozza meg a lemez elrendezését a *Plate Setup* menüpont alatt a *View/Edit Plate* menüpontban. Kattintson a *Select Fluorophores* gombra a használt FAM és ROX festékek kiválasztásához. A megfelelő markerek, ACTB (FAM) és ZNF671 (ROX) a *Target Names* menüpont alatt választhatók ki. Írja be a nevet a *Sample Names* menüpontba.
- A szabad pozíciók meg vannak jelölve, és az *Exclude Wells in Analysis* jelölőnégyzet bejelölésével kizárhatók az elemzésből.
- Az OK gombbal erősítse meg a lemez elrendezését.
- Állítsa be az elemzési beállításokat a *Settings* alatt. A *Baseline Threshold* alatt található paramétereket minden fluorofór esetében külön kell megadni. Ehhez a *Quantification* fülön található markereket ki kell jelölni vagy be kell jelölni.

Elemzési beállítások a CFX96 valós idejű detektáló rendszeren

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

- Válassza ki az összes mintát, és exportálja mindkét marker adatait egyszerre .xlsx fájlként egy megfelelő helyre, egyedi névvel, az *Export to Excel* gombra kattintva.
- Formázza az adatokat úgy, hogy a különböző minták eredményei egymás alatt, a ZNF671 és ACTB markerek pedig egymás mellett jelenjenek meg.

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

A PCR futtatás érvényességének ellenőrzése

A PCR futtatás akkor érvényes, ha a pozitív és negatív kontrollok megfelelnek a következő kritériumoknak:

A ScreenYu Gyn® kontrollok érvényességi kritériumai

Marker	Cq érték a pozitív kontroll esetében	Cq érték a negatív kontroll esetében
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	nincs érték
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	nincs érték

A minták érvényességének ellenőrzése

A betegmintának akkor érvényes az eredménye, ha az ACTB kontrollmarker megfelel a következő kritériumnak:

A betegminták érvényességi kritériumai

Marker	Cq érték a betegmintára
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

A ScreenYu Gyn® teszt elemzése

Ha a metilációs marker ZNF671

- nem ad Cq értéket, a **ScreenYu Gyn® eredménye negatívnak** minősül.
- Cq értéket ad $> 0; < 20$, akkor a **ScreenYu Gyn® eredménye** ennek a mintának **érvénytelennek** minősül.
- Cq értéket ad $\geq 20; \leq 42$, a ΔCq -t a következő egyenlet szerint számolják ki:

A ΔCq kiszámítása

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

Ha $\Delta Cq \leq 10,00$, akkor a **ScreenYu Gyn® eredménye pozitívnak** minősül.

Ha $\Delta Cq > 10,00$, akkor a **ScreenYu Gyn® eredménye negatívnak** minősül.

A pozitív ScreenYu Gyn® eredmény méhnyakrák vagy méhnyakrák előtti állapot jelenlétével társul. A ScreenYu Gyn® eredményét nem szabad végleges terápiás döntés alapjául tekinteni, hanem más orvosi leletekkel együtt kell értékelni.

12 SCREENYU GYN® TELJESÍTMÉNY

A CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System teljesítményadatai láthatók. Amennyiben az adatok eltérnek a cobas z 480 Analyzer adataitól, azokat külön feltüntettük. Ha a cobas z 480 Analyzer adatai nincsenek kifejezetten feltüntetve, azok megegyeznek a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System adatával.

12.1 Analitikai teljesítmény

12.1.1 Analitikai érzékenység

A PCR-vizsgálat analitikai érzékenységét metilált, biszulfittal konvertált humán genomikus DNS felhasználásával határozták meg. A megfelelő detektálási határértékeket az alábbi táblázat tartalmazza. A hígítási sorozatot 9-szeres meghatározással tesztelték. Átlagosan 120–180 ng DNS-t használnak a vizsgálatban egy kenethez.

Analitikai érzékenység – 1. rész

Használt DNS	A vizsgálatban szereplő sejtek hozzávetőleges száma *	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
0,2 ng	30 sejt	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 sejt	9 / 9	9 / 9
0,05 ng	7,5 sejt	9 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 sejt	9 / 9	9 / 9
0,01 ng	1,5 sejt	9 / 9	7 / 9
0,005 ng	< 1 sejt	5 / 9	3 / 9

* egy sejt körülbelül 6–7 pg genomikus DNS-t tartalmaz

A CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System rendszeren a két marker kimutatási határa összesen 3 sejt (0,02 ng) a teljes mintában.

A cobas z 480 Analyzer készüléken a két marker kimutatási határa összesen 7,5 sejt (0,05 ng) a teljes mintában.

A ScreenYu Gyn® teszt kvantifikációs határai megegyeznek a kimutatási határokkal, ami $R^2 = 0,99$ lineáris viszonyt eredményez mindkét marker esetében a kvantifikációs határokon belül.

Ezenkívül metilált, biszulfittal konvertált genomikus humán DNS és nem metilált genomikus humán DNS DNS-keveréket is teszteltek. Mindegyik esetben 20 ng DNS-t vagy 100 ng DNS-t használtak vizsgálatonként. A hígítási sorozatot háromszoros vagy 9-szeres meghatározással tesztelték.

Analitikai érzékenység – 2. rész

A metilált DNS aránya	Teljes DNS	ScreenYu Gyn® pozitív
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

A ZNF671 marker pozitív eredményének kimutatási határa 0,1 % metilált DNS egy olyan mintában, amely összesen 20 ng DNS-t vagy 100 ng DNS-t tartalmaz vizsgálatonként.

12.1.2 Analitikai specifitás – nem metilált DNS kimutatása

A PCR-vizsgálat analitikai specifitását a humán genomot képviselő, 10–12 kb méretű nem metilált PCR-fragmentumok felhasználásával határozták meg. Ötszörös meghatározást végeztek. Az eredményeket az alábbi táblázat tartalmazza. A mintákat az ACTB marker segítségével érvényesnek minősítették. 1000 ng nem metilált, biszulfittal konvertált DNS (biDNS) koncentrációig nem kaptak hamis pozitív ScreenYu Gyn® eredményt.

A PCR-vizsgálat analitikai specifitása

Használt DNS	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
100 ng nem metilált biDNS	0 / 5	5 / 5
250 ng nem metilált biDNS	0 / 5	5 / 5
500 ng nem metilált biDNS	0 / 5	5 / 5
1000 ng nem metilált biDNS	0 / 5	5 / 5
1000 ng genomikus DNS	0 / 5	0 / 5

12.2 Precizitás

12.2.1 Ismételhetőség

Két biszulfittal átalakított betegmintát tíz független futtatásban teszteltek a ScreenYu Gyn® assay-jel (mindegyikben 4 ismétléssel). Az összes 40 meghatározásban a Pap I minta negatív ScreenYu Gyn® eredményt, a CIN3 pedig pozitív ScreenYu Gyn® eredményt mutatott. Így a minták 100 %-os ismételhetőséget mutatnak.

12.2.2 Reprodukálhatóság

Öt központban 20 betegmintát vizsgáltak ScreenYu Gyn® segítségével. Minden alkalommal különböző személyek végezték el az új minták előkészítését és biszulfátkezelését, különböző qPCR-eszközök (cobas z 480 Analyzer, LightCycler® 480 I, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System) felhasználásával. A 20 betegmintából 18 volt konzisztens. Ez 90%-os reprodukálhatóságot jelent.

12.3 Valódiság

A ScreenYu Gyn® teszt valódiságát 15 betegmintán végzett Sanger-szekvenálással ellenőrizték. A negatív eredményt adó betegmintákban nem mutattak ki metilált citozinokat a megfelelő genom régióban. A pozitív eredményt adó betegmintákban a szekvencián belül a megfelelő ZNF671 genom régiót mutatták ki, magas metilációs fokkal.

12.4 Pontosság

A ScreenYu Gyn® teszt pontosságát a precizitás és a valódiság összege adja.

12.5 Robusztusság

A SiHa sejtekkel dúsított kenetmintákban nem figyeltek meg interferenciát, amikor a következő anyagok megnövelt koncentrációját adták a mintához:

- legfeljebb 0,5 % Lugol-oldat
- legfeljebb 0,5 % ecetsav

12.6 Cut-off érték

Az optimális vizsgálati küszöbértéket az úgynevezett Youden-index segítségével határozták meg. A ScreenYu Gyn® pozitív eredményéhez a következő kritériumoknak kell teljesülniük:

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

$\Delta Cq_{ZNF671-CTB} \leq 10 \rightarrow$ A ScreenYu Gyn® eredmény pozitív

$\Delta Cq_{ZNF671-CTB} > 10 \rightarrow$ A ScreenYu Gyn® eredmény negatív

Cobas z 480 Analyzer

$\Delta Cp_{ZNF671-CTB} \leq 9 \rightarrow$ A ScreenYu Gyn® eredménye pozitív

$\Delta Cp_{ZNF671-CTB} > 9 \rightarrow$ A ScreenYu Gyn® eredmény negatív

12.7 Klinikai teljesítményértékelés

Az itt használt betegmintákat európai klinikákról (Németország, Portugália) szereztük be.

A betegminták biszulfátkezelését az EZ DNA Methylation-Lightning Kit segítségével végeztük, 18 000 xg centrifugálási sebességgel és 20 perces deszulfátosítási idővel.

A ScreenYu Gyn® klinikai teljesítményének értékeléséhez 616 betegmintát vizsgáltak, az eredmények előfordulási megoszlása a következő volt: Pap I (n = 380; 61,7 %), CIN 1 (n = 47; 7,6 %), CIN 2 (n = 50; 8,1 %), CIN 3 (n = 132; 21,4 %), méhnyakrák (n = 7; 1,1 %). Az érvénytelen minták aránya 1,3 % volt (n = 8).

A megállapított küszöbérték alapján kiszámították a klinikai érzékenységet és specifitást.

A ScreenYu Gyn® klinikai teljesítményének értékelése

Cytológiai/hisztológiai eredmények	Detektálás	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 %

Klinikai teljesítményadatok CIN 3+ / Pap I	Érték	KI 95 %
Érzékenység	64,75 %	56,2 % - 72,7 %
Specifitás	90,67 %	87,3 % - 93,4 %
Pozitív prediktív érték	72,00 %	63,3 % - 79,7 %
Negatív prediktív érték	87,40 %	83,7 % - 90,5 %
Pozitív valószínűségi arány	6,96	-
Negatív valószínűségi arány	0,39	-

KI = konfidencia intervallum

13 AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

- A ScreenYu Gyn® eredmények értelmezését mindig további laboratóriumi diagnosztikai eljárások eredményeivel együtt, valamint a klinikai kép figyelembevételével kell elvégezni.
- A hibás eredmények elkerülése érdekében be kell tartani a használati utasításban szereplő előírásokat, pl. a pipettázási mennyiségeket, az inkubációs időket, a hőmérsékleteket és az előkészítési lépéseket.
- A megfelelő mintavétel és tárolás kritikus fontosságú a vizsgálati eredmények szempontjából.
- Elvileg molekuláris biológiai vizsgálati eljárásoknál nem zárható ki, hogy a vizsgálati eredményt befolyásolhatnak további, nagyon ritka szekvencia-variánsok, amelyek még nem szerepelnek a primerek és próbák specifikitásának és érzékenységének elemzéséhez felhasznált forrásokban.
- A műszer nem előírt teljesítménye, valamint a leírt vizsgálati eljárástól, a megadott tárolási feltételektől, anyagoktól, berendezésektől vagy ajánlott mintavételi anyagoktól való eltérések eltéréseket eredményezhetnek az összes előírásnak megfelelően kapott eredményektől.
- A mellékelt belső és külső kontrollok segítenek a hibák felismerésében. Azonban nem minden lehetséges hibát képesek felismerni. A felhasználó felelőssége, hogy ellenőrizze az esetleges módosításokat, vagy ha szükséges, a használt eszközöket, és biztosítsa az eszköz specifikációinak betartását.

14 HIVATKOZÁSOK

- [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). A humán papillomavírus világszerte az invazív méhnyakrák szükséges oka. *J Pathol.* 189(1):12-19
- [3] Cuzick et al. (2006). Áttekintés az európai és észak-amerikai tanulmányokról a HPV-tesztelésről az elsődleges méhnyakrák-szűrésben. *Int J Cancer.* 119(5):1095-1101
- [4] Hansel et al. (2014). Ígéretes DNS-metilációs jel a magas kockázatú, DNS-pozitív humán papillomavírussal fertőzött nők szűréséhez. *PLOS ONE.* 9. évfolyam, 3. szám, e91905
- [5] Schmitz et al. (2017). Metiláció-specifikus valós idejű PCR-vizsgálat teljesítménye HPV-pozitív nők szűrésére. *Klinikai epigenetika.* 9:118
- [6] Schmitz et al. (2018). DNS-metilációs marker panel teljesítménye folyadékalapú méhnyakkaparással alkalmazásával méhnyakrák és annak előrákos stádiumainak kimutatására. *BMC Cancer.* 18:1197
- [7] Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (2008). Európai irányelvek a méhnyakrák szűrés minőségbiztosítására – Második kiadás

15 FELELŐSSÉG

A ScreenYu Gyn® Kit kizárólag rendeltetésszerűen használható. Az Epitype GmbH nem vállal felelősséget más felhasználásért (pl. a jelen használati utasítás be nem tartása és nem megfelelő használat) és az abból eredő károkért.

16 KÉRDÉSEK ÉS PROBLÉMÁK

Ha kérdése vagy problémája van a termékkel kapcsolatban, kérjük, vegye fel a kapcsolatot az Epitype GmbH képviselőjével.

Az Epitype GmbH műszaki ügyfélszolgálat a hétfőtől péntekig 8 és 16 óra között elérhető a következő telefonszámon: +49 (0) 3641 5548500

Irodai munkaidőn kívül e-mailben is elérhetőek vagyunk: support@epitype.de

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

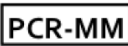
01109 Dresden (Drezda), Deutschland (Németország)

Ügyvezetők: Dr. Alfred Hansel, Dr. Martina Schmitz, Dr. Timm Zörgiebel

17 TOVÁBBI MEGJEGYZÉSEK

- Szabályozási tájékoztatás az Európai Unióban élő ügyfelek számára: Felhívjuk figyelmét, hogy köteles jelenteni az illetékes hatóságnak és az Epitype GmbH-nak minden olyan súlyos eseményt, amely a termékkel kapcsolatban történt.
- A termék biztonsági adatlapjának aktuális verziója a weboldal letöltési központjában (<https://www.epitype.de/en/downloadcenter/>) található, vagy e-mailben kérhető a support@epitype.de címen.

18 A SZIMBÓLUMOK JELENTÉSE

Szimbólum	Jelentés	Szimbólum	Jelentés
	Mastermix		Tárolási hőmérséklet
	PCR csíkok		Nyitás nélkül felhasználható (ÉÉÉÉ-HH-NN)
	Sapka		A tartalom elegendő <n> teszt elvégzéséhez
	Pozitív kontroll		Gyártó
	Víz		Kövesse a használati utasítást
	in vitro diagnosztika		Napfénytől védve tárolandó
	Tételjelölés		Ne használja újra
	Hivatkozási szám		CE jelölés

19 VÁLTOZÁSOK LISTÁJA

Előző verzió (Kiadás dátuma)	Változások
8 (2025-09)	Fordítási hibák javítása: - Fejezetcímek javítása • 12.2 Pontosság → Precizitás • 12.3 Pontosság → Valódiság • 12.4 Precízió → Pontosság • 12.6 Határérték → Cut-off érték - A 12.3 fejezetben szereplő mondatok javítása: • A ScreenYu Gyn® teszt valódiságát 15 betegmintán végzett Sanger-szekvenálással ellenőrizték. - A 12.4 fejezetben szereplő mondatok javítása: • A ScreenYu Gyn® teszt pontosságát a precizitás és a valódiság összege adja. A rövid jegyzőkönyv láblécének optimalizálása, az IFU verziójára való hivatkozás

20 RÖVID PROTOKOLL

Az alábbiakban egy ellenőrzőlista formájú gyors útmutató sablonját találja.

A gyors útmutató használata előtt olvassa el figyelmesen a 11 fejezetben részletesen leírt használati utasítást, beleértve az összes megjegyzést.

A biszulfát-készlet nem része a ScreenYu Gyn® Kitnek. A minták biszulfát-kezelését az EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD) készlettel kell elvégezni (további információkért lásd a 7 fejezetet).

Minták előkészítése

- ☐ A betegmintákat 5 másodpercig maximális sebességgel keverje össze, majd 1 ml-t helyezzen át egy 1,5 ml-es reakciócsőbe.
- ☐ Centrifugálja a mintákat 5 percig 10 000 xg sebességgel.
- ☐ Vegye ki és dobja ki a pellet feletti 900 µl felülúszót.

A minták biszulfátkezelése

- ☐ Készítse elő az EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) készletet a gyártó utasításai szerint.
- ☐ A pellet újraszuszpendálása
- ☐ Készítse elő a reakciót egy 0,5 ml-es reakciócsőben, keverje össze vortexen, majd centrifugálja

Reakció a biszulfát-konverzióhoz

Összetevő	Reakciónként
Lightning Conversion Reagent	130 µl
Újra szuszpendált minta	20 µl
Teljes térfogat	150 µl

- ☐ Végezze el a biszulfátkezelést az EZ DNA Methylation-Lightning Kit gyártójának utasításai szerint, és kövesse az alábbi további lépéseket:
- ☐ Az utolsó mosási lépés után öntse ki az átfolyó folyadékot
- ☐ Centrifugálja az oszlopot az üres Collection-Tube-ben 1 percig teljes sebességgel, hogy teljesen megszáradjon
- ☐ Helyezze az oszlopot egy 1,5 ml-es reakciócsőbe
- ☐ Pipetázzon 15 µl M-Elution Buffer az oszlopra, és centrifugálja 8000 xg sebességgel 30 másodpercig

A PCR előkészítése és pipettázása

- ☐ Centrifugálja a mintát
- ☐ Vortexelje és centrifugálja a ScreenYu Gyn® Mastermixet.
- ☐ Vegye le a PCR kupakokat a ScreenYu Gyn® Strips-ről, és dobja ki őket
- ☐ Pipetázzon 10 µl ScreenYu Gyn® Mastermix-et minden üregbe
- ☐ Pipetázzon 10 µl mintát vagy ScreenYu Gyn® Positive Control (az A1 üregbe) vagy ScreenYu Gyn® Water (a B1 üregbe)
- ☐ Zárja le a ScreenYu Gyn® Strips-t a fel nem használt ScreenYu Gyn® Caps-kal (átlátszó tasak)
- ☐ Vortexelje és centrifugálja a ScreenYu Gyn® Strips

A PCR elvégzése

- ☐ Kapcsolja be a valós idejű PCR készüléket, szükség esetén nyissa meg a szoftvert, és válassza ki a ScreenYu Gyn Template-t
- ☐ Nevezze el a PCR futtatását, szerkessze a lemez elrendezését, ellenőrizze a hőmérsékleti protokollt

PCR hőmérsékleti protokoll

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)	

- ☐ Helyezze a ScreenYu Gyn® Strips és a Balance Strips a készülékbe, és indítsa el a PCR futtatást

A PCR-adatok elemzése és értelmezése

- ☐ Nyissa meg az exportált fájlt, és egyesítse az adatokat egy megfelelő táblázatkezelő programban
- ☐ Formázza az adatokat úgy, hogy a különböző minták eredményei egymás alatt, a ZNF671 és ACTB markerek pedig egymás mellett jelenjenek meg
- ☐ Ellenőrizze a pozitív kontroll és a negatív kontroll eredményeit mindkét marker esetében
- ☐ Elemesse az összegyűjtött minták eredményét

A ScreenYu Gyn® vizsgálatban egy minta akkor tekinthető pozitívnak, ha a következő kritériumok teljesülnek:

Érvényességi és pozitivitási kritériumok

PCR-készülék	Marker	Ct érték	$\Delta Ct_{ZNF671 - ACTB}$
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	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 10,00$

A ScreenYu Gyn® pozitív eredménye méhnyakrák vagy méhnyakrák előtti állapot jelenlétével társul. A ScreenYu Gyn® eredménye nem tekinthető végleges terápiás döntésnek, és más orvosi leletekkel együtt kell értékelni.