



GynTect®

Basis UDI-DI: 426076785GYNTECTYM

Gebrauchsanweisung

REF

GT003-06

GT003-10



6 Proben

10 Proben

UDI-DI

4260767851017

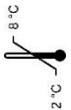
4260767851116



Bitte diese Gebrauchsanweisung vor Gebrauch des Tests aufmerksam lesen und genauestens befolgen, um die Zuverlässigkeit der Testergebnisse sicher zu stellen.

GynTect® ist ein In-Vitro Diagnostik-Kit für den qualitativen Nachweis von sechs epigenetischen Markern in Bisulfit-konvertierter DNA aus Zervikalproben von Frauen mit positivem HPV-Testergebnis oder mit einem noch abzuklärenden Pap-Befund. Ein positives GynTect® Testergebnis korreliert mit dem Vorhandensein einer zervikalen, intraepithelialen Neoplasie oder eines Zervixkarzinoms.

Nur Verwendung für die In-Vitro Diagnostik (IVD) durch geschultes Personal .



Revision 6

September 2024



oncnostics GmbH
Löbstedter Straße 41 • 07749 Jena • Deutschland
Telefon: +49 (0) 3641 5548500
kontakt@oncnostics.com • www.oncnostics.com



LAGERUNG UNMITTELBAR NACH ANLIEFERUNG

Das GynTect® Kit wird bei Raumtemperatur versendet und die Überschreitung des validierten Temperaturintervalls mittels Temperaturmesspunkt überwacht. Überprüfen Sie direkt nach Anlieferung den am Kit angebrachten Temperaturmessstreifen auf Farbumschlag (siehe Abbildung 1), sowie die Umverpackung, Versiegelung und Primärverpackung auf Intaktheit. Das Kit muss nach Erhalt umgehend bei 2 °C bis 8 °C gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt werden. Bei fachgerechtem Transport und sachgemäßer Aufbewahrung können das GynTect® Kit und seine Komponenten bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

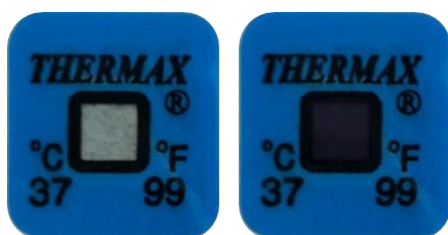


Abbildung 1 Überwachung der Transport-Temperatur

Der am GynTect® Kit angebrachte Temperaturmesspunkt überwacht die Temperatur während des Transportes. Ein hell-silberner Punkt zeigt, dass das Kit unter Einhaltung der Transporttemperatur geliefert wurde. Ein schwarzer Punkt beweist die Nichteinhaltung der vorgeschriebenen Transporttemperatur, wodurch die Leistungsparameter des GynTect® Kits nicht mehr gewährleistet werden können. Wenden Sie sich in diesem Fall an die oncnostics GmbH.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zweckbestimmung	5
2.	Klinische Bedeutung	5
3.	Testprinzip	5
4.	Design des GynTect® Assays	7
4.1.	GynTect® Strips	7
4.2.	Kontrollen	7
4.2.1.	Qualitätskontrolle Bisulfitbehandlung (ACHE)	7
4.2.2.	Qualitätskontrolle Methylierung (IDS-M)	8
4.2.3.	Positivkontrolle	8
4.2.4.	Negativkontrolle	8
5.	Referenzmaterial	8
6.	Inhalt des Kits	8
7.	Verbrauchsmaterialien und Equipment (nicht im Kit enthalten)	9
8.	Lagerung und Haltbarkeit	10
9.	Sicherheitshinweise	10
9.1.	Allgemeine Hinweise	10
9.2.	Raumaufteilung	11
9.3.	Vermeidung von Kontaminationen	12
9.4.	Anleitung zur Handhabung	12
10.	Entsorgung	12
11.	GynTect® Verfahren	13
11.1.	Arbeitsablauf	13
11.2.	Probenentnahme	13

11.3.	Probenvorbereitung	14
11.4.	Bisulfitbehandlung der Proben.....	14
11.4.1.	Bisulfitkonvertierung der DNA	14
11.4.2.	Aufreinigung der konvertierten DNA	16
11.5.	PCR.....	17
11.5.1.	Vorbereitung und Pipettieren der PCR	17
11.5.2.	Durchführung der PCR am cobas z 480 Analyzer.....	19
11.5.3.	Durchführung der PCR am CFX96 Real-Time PCR Detection System.....	22
11.6.	Auswertung und Interpretation der PCR-Daten	25
12.	Leistungsmerkmale von GynTect®	28
12.1.	Analytische Leistungsbewertung	28
12.1.1.	Analytische Sensitivität – Detektion methylierter DNA.....	28
12.1.2.	Analytische Spezifität – Detektion unmethylierter DNA	29
12.2.	Präzision	30
12.2.1.	Wiederholbarkeit	30
12.2.2.	Reproduzierbarkeit	30
12.3.	Robustheit	30
12.4.	Klinische Leistungsbewertung	31
13.	Grenzen des Verfahrens	32
14.	Literatur.....	32
15.	Haftung.....	33
16.	Fragen und Probleme.....	33
17.	Zusätzliche Hinweise	34
18.	Bedeutung der Symbole.....	34
19.	Änderungsverzeichnis	35
20.	Kurzprotokoll	35

1. ZWECKBESTIMMUNG

GynTect® ist ein In-Vitro Diagnostik-Kit für den qualitativen Nachweis von sechs epigenetischen Markern in Bisulfit-konvertierter DNA aus Zervikalproben von Frauen mit positivem HPV-Testergebnis oder mit einem noch abzuklärenden Pap-Befund. Ein positives GynTect® Testergebnis korreliert mit dem Vorhandensein einer zervikalen, intraepithelialen Neoplasie oder eines Zervixkarzinoms.

GynTect® ist nur zur Verwendung durch qualifiziertes Personal im Labor bestimmt, das mit molekularbiologischen Techniken vertraut ist.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Das Zervixkarzinom ist die vierthäufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit mit jährlich >600.000 Neuerkrankungen [1]. In praktisch allen Fällen liegt eine persistierende Infektion mit einem karzinogenen humanen Papillomavirus (HPV) zu Grunde [2] und ist Voraussetzung für die Entstehung eines Zervixkarzinoms. HPV-negative Frauen haben ein extrem geringes Risiko an Gebärmutterhalskrebs zu erkranken. Doch auch die meisten Frauen mit einer HPV-Infektion entwickeln keine Krebsvorstufe. Bei nur etwa 15 % der nachweislich mit HPV infizierten Frauen entsteht tatsächlich eine zu behandelnde Krebsvorstufe oder ein Karzinom [3].

Patientinnen mit einem positiven HPV-Test oder mit einem noch abzuklärenden Pap-Befund (Pap II, Pap III und Pap IIID1 und D2) kann daher empfohlen werden, mit Hilfe eines Triage Tests, wie GynTect®, die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer zu behandelnden Krebserkrankung oder dessen Vorstufe mit großer Genauigkeit zu bestimmen.

GynTect® ist nicht als letzte Therapieentscheidung einzusetzen und muss in Verbindung mit anderen ärztlichen Befunden ausgewertet werden.

3. TESTPRINZIP

GynTect® basiert auf dem Nachweis von epigenetischen Biomarkern, d.h. Methylierungen von spezifischen DNA-Abschnitten, deren Vorkommen mit der Existenz von präkanzerösen Läsionen oder einem Zervixkarzinom korreliert [4, 5, 6]. Zudem wird je ein bisulfitspezifischer und methylierungsspezifischer Referenzmarker analysiert. Die Markerregionen werden in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Übersicht der GynTect® Markerregionen

Bezeichnung im Protokoll	Markerregion (Gen Bezeichnung)
Methylierungsmarker	ASTN1
	DLX1
	ITGA4
	RXFP3
	SOX17
	ZNF671
Kontrollmarker	ACHE
	IDS-M

Der Nachweis wird mithilfe der hochsensitiven real-time PCR-Methode durchgeführt. Als Output der Real-Time Geräte dienen der Cp-Wert (Cross point, cobas z 480 Analyzer), bzw. Cq-Wert (Cycle quantification, CFX96 Real-Time PCR Detection System), welche beide dem Cycle Threshold Ct-Wert entsprechen und nachfolgend auch als solcher bezeichnet werden. Dieser Wert entspricht dem Zyklus in einer Real-Time PCR, bei der die Fluoreszenz erstmalig über einen definierten Hintergrundwert ansteigt.

Die Analyse einer Patientenprobe mit GynTect® umfasst zwei Schritte.

Zuerst wird die DNA aus dem Zervixabstrich in einer Bisulfitreaktion konvertiert und die Methylierung fixiert. Für die Aufreinigung der DNA nach der Bisulfitkonvertierung wird in der Gebrauchsanweisung von GynTect® ein verkürztes Protokoll empfohlen. Die Proben werden nach der Elution mit Wasser verdünnt. Im zweiten Schritt wird die Bisulfit-behandelte DNA in einer acht-Singleplex methylierungsspezifischen real-time PCR analysiert. Die ursprünglich methylierten DNA-Abschnitte werden mit Hilfe der in einem GynTect® Strips vorliegenden Primer selektiv amplifiziert.

Die Detektion der Methylierungs- und Kontrollmarker wird unter Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes durchgeführt. Außerdem werden zur Kontrolle der PCR jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Anschließend erfolgt die Assay-spezifische Auswertung.

Probenentnahme und Bisulfit-Kit sind nicht Teil des GynTect® Kits. Speziell vorgesehene Produkte für die Probenentnahme und die Bisulfitbehandlung sind separat erhältlich.

Das Testprinzip ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

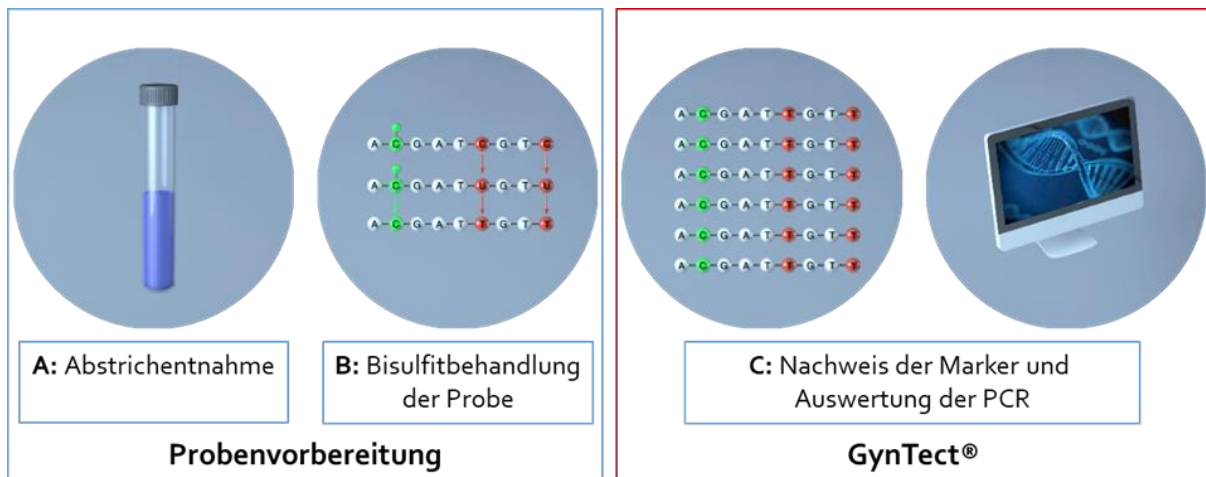


Abbildung 2 Testprinzip

A: Der Gynäkologe entnimmt mit einem geeigneten Probenentnahmesystem einen Abstrich vom Gebärmutterhals der Patientin.

B: Das Diagnostiklabor führt eine Bisulfitbehandlung der Patientenprobe durch.

C: Pro Probe werden acht-Singleplex-PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Auswertung erfolgt über die Detektion des im Mastermix enthaltenen interkalierenden Farbstoffes anhand definierter Schmelzkurvenpeaks.

4. DESIGN DES GYNTECT® ASSAYS

4.1. GynTest® Strips

Jeder GynTest® Strip enthält acht Primerpaare zur Amplifikation von sechs methylierungsspezifischen Markern und zwei Kontrollmarkern. Das Layout der GynTest® Strips ist in Abbildung 3 gezeigt.

Zur Analyse einer Patientenprobe wird ein kompletter GynTest® Strip benötigt.



Abbildung 3 Aufbau der GynTest® Strips

Die Positionen 1 - 6 der PCR-Streifen enthalten jeweils einen methylierungsspezifischen Marker für eine Genregion. Position 7 der PCR-Streifen enthält den Marker für die Bisulfit-Qualitätskontrolle (ACHE) und Position 8 den Marker für die Methylierungs-Qualitätskontrolle (IDS-M).

4.2. Kontrollen

Das Design des GynTest® Kits umfasst einige Kontrollen. Mehrere Kontrollsysteme überwachen kritische Schritte des Tests, einschließlich Probenqualität und Bisulfitbehandlung (ACHE), Methylierungsstatus der Proben (IDS-M) und die Qualität der PCR-Reaktion.

4.2.1. Qualitätskontrolle Bisulfitbehandlung (ACHE)

Dieser Kontrollmarker überprüft die erfolgreiche Konvertierung aller nicht-methylierten Cytosine zu Uracil und damit die Qualität der durchgeführten Bisulfitbehandlung. Der Nachweis erfolgt durch die Amplifikation des menschlichen Gens Acetylcholinesterase (ACHE). Wenn keine ACHE-Amplifikation stattfindet, wird der Assay der Probe invalide gewertet und muss wiederholt werden.

4.2.2. Qualitätskontrolle Methylierung (IDS-M)

Diese Kontrolle detektiert das methylierte Imprinted Gene IDS (IDS-M), welches auf dem zweiten X-Chromosom der Frau vorliegt. Wird in der PCR-Reaktion ein Ct-Wert zwischen 20 und 32 generiert, so ist die zervikale Probe valide. Wenn keine oder eine unzureichende Amplifikation stattfindet, wird der Assay der Probe invalide gewertet und muss wiederholt werden.

4.2.3. Positivkontrolle

Die Positivkontrolle überwacht die Qualität der PCR-Reaktion. Bei der Amplifikation des Kontroll-Templates GynTect® Positive Control (PC) muss für alle acht Marker ein Ct-Wert unterhalb von 38 erzeugt werden. Andernfalls ist die PCR-Reaktion invalide und muss wiederholt werden.

4.2.4. Negativkontrolle

Bei der Negativkontrolle handelt es sich um eine Kontrollreaktion mit GynTect® Water (Wasser, NTC – No Template Control) als Template, die in allen Fällen negativ sein muss. Treten spezifische Produktpeaks in der Negativkontrolle auf, ist eine Kontamination sehr wahrscheinlich und GynTect® muss wiederholt werden.

5. REFERENZMATERIAL

Es ist kein internationales Referenzmaterial verfügbar.

6. INHALT DES KITS

Tabelle 2 Inhalt des GynTect® Kits

Bezeichnung der Komponenten	Symbol	Inhalt	Volumen / Menge	
			GT003-06	GT003-10
GynTect® Mastermix	PCR-MM	2 x PCR-Mastermix ¹	1 x 1,1 ml	1 x 1,1 ml
GynTect® Strips	STRIPS	PCR-Streifen ² für Patientenproben (grüne Deckel)	6 Stück	10 Stück
		PCR-Streifen ² für Positivkontrollen (rote Deckel)	3 Stück	1 Stück
		PCR-Streifen ² für Negativkontrollen (gelbe Deckel)	3 Stück	1 Stück
GynTect® Caps	CAPS	PCR-Deckel-Streifen	12 Stück	12 Stück
GynTect® Positive Control	CONTROL+	Positivkontrolle	1 x 260 µl	1 x 90 µl
GynTect® Water	H₂O	Wasser	1 x 2 ml	1 x 2 ml
Instructions for use	-	Gebrauchsanweisung	1	1

¹ Enthält alle für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) benötigten Komponenten, außer Primer und Template.

² Enthält die für die PCR benötigten Primer.

7. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND EQUIPMENT (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

GynTect® darf nur zusammen mit dem aufgeführten Verbrauchsmaterial und Equipment und nur von Fachpersonal angewendet werden. Alle benötigten Laborgeräte müssen entsprechend der Herstellerangaben installiert, kalibriert, gehandhabt und gewartet werden.

Raumtemperatur wird definiert als Temperatur zwischen 15 °C und 30 °C.

Tabelle 3 Benötigtes Equipment

Equipment	Katalog Nr.	Order
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) *	Z102	order@oncnostics.com
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	-	via Hologic Inc.
Cervex-Brush® bzw. Cervex-Brush® Combi	-	via Rovers Medical Devices

* Das EpiTect® **Fast** Bisulfite Kit (Katalognr. QIAGEN: 59802) ist nicht mit dem EpiTect® Bisulfite Kit zu verwechseln!

Die folgende Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien werden benötigt, um den GynTect® Assay durchzuführen.

- Zentrifuge für 0,5 ml/1,5 ml Reaktionsgefäße, $\geq 10.000 \times g$
- Zentrifuge für PCR-Streifen
- Thermocycler für 0,5 ml Reaktionsgefäße
- Vortex / Schüttler
- Pipetten verschiedener Volumenbereiche und dazugehörige Filterspitzen (steril, DNase frei)
- Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml (DNase frei)
- Reaktionsgefäßständer für 0,5 ml/1,5 ml Reaktionsgefäße
- Ethanol 96-100 %, unvergällt
- Real-Time PCR-Gerät, Detektionskanal FAM/SYBR Green

Der GynTect® Assay wurde mit den folgenden Real-Time PCR-Geräten validiert:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) mit 96-Well-Block, Adapter für PCR-Streifen und LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0 (Service Pack 3), Auswertung mit Version 1.5.1.62
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mit CFX Maestro Software Version 2.3
- CFX Opus 96 (Dx) Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mit CFX Maestro Software Version 2.3

8. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Bei fachgerechtem Transport und sachgemäßer Aufbewahrung können das GynTect® Kit und seine Komponenten bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Alle im Kit enthaltenen Reagenzien sind nach erstmaligem Öffnen bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie unter den angegebenen Bedingungen gelagert und gegen Kontamination geschützt werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 Lagerungstemperatur des GynTect® Kits sowie des nicht im Kit enthaltenen Equipments

Equipment	Lagerungstemperatur
GynTect® Kit	2 °C bis 8 °C
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) ausgenommen	15 °C bis 25 °C
Spin Columns, DNA Protect Buffer, Buffer BD	2 °C bis 8 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C bis 30 °C
Cervex-Brush® bzw. Cervex-Brush® Combi	15 °C bis 30 °C

9. SICHERHEITSHINWEISE

9.1. Allgemeine Hinweise

Bei der Etablierung von modernsten molekularbiologischen Methoden müssen folgende Hinweise genau befolgt werden, um eine maximale Sicherheit für das Laborpersonal zu gewährleisten und qualitativ hochwertige Ergebnisse zu erreichen:

- Da es sich bei der Durchführung um molekularbiologische Prozesse, wie Bisulfitbehandlung, Amplifikation und den Nachweis von DNA handelt, ist dieses Kit nur zur In-Vitro Diagnostik vorgesehen und darf ausschließlich von Personal verwendet werden, das in den Laborpraktiken für die In-Vitro Diagnostik geschult wurde.
- Vor Verwendung des Produktes ist die Gebrauchsanweisung gründlich zu lesen. Es ist nur die gültige Version zu verwenden.
- Tragen Sie bei jedem Arbeitsschritt einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und gegebenenfalls eine Schutzbrille.
- Vermeiden Sie den direkten Kontakt mit den biologischen Proben sowie ein Verspritzen oder Versprühen der Proben.
- Heizdeckel und Inkubationsblock des Thermocyclers können Temperaturen von bis zu 110 °C erreichen. Es besteht die Gefahr von Hautverbrennungen. Bitte beachten Sie die Bedienungsanleitung des Gerätes.
- Waschen Sie Ihre Hände nach der Handhabung von Proben und Reagenzien gründlich.
- Verwenden Sie GynTect® nicht, wenn die Verpackung der Reagenzien beschädigt ist. Setzen Sie sich mit Ihrem Händler in Verbindung.

- Verwenden Sie das GynTect® Kit nicht nach dem Haltbarkeitsdatum und verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen und mischen Sie die Kit-Reagenzien nicht mit Reagenzien anderer Hersteller.
- Verwenden Sie nur Materialien, die mit dem Kit geliefert wurden bzw. vom Hersteller empfohlen werden.
- Alle benötigten Laborgeräte müssen entsprechend der Herstellerangaben installiert, kalibriert, gehandhabt und gewartet werden.
- Das Pipettieren von kleinen Flüssigkeitsmengen im Mikroliterbereich erfordert Übung. Achten Sie daher darauf, dass Sie die benötigten Volumina mit den Mikropipetten so präzise wie möglich pipettieren.
- Die geltenden regulatorischen Anforderungen an den Betreiber sind einzuhalten.
- Das Befolgen der Guten Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP), wie sie beispielsweise von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) oder der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) beschrieben ist, wird vorausgesetzt. Im Speziellen sind Empfehlungen für die Durchführung von molekularen Amplifizierungstests zu berücksichtigen.
- Die Funktionalität der PCR-Geräte ist nur im Bereich der Raumtemperatur gewährleistet.

9.2. Raumaufteilung

Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität einer PCR sollte strengstens darauf geachtet werden, dass die Reinheit der Kit-Komponenten und der Proben gewahrt bleibt.

Durch die PCR werden Abschnitte der in der Probe vorhandenen DNA millionen- bis milliardenfach vervielfältigt. Kleinste Mengen (z.B. auch als Aerosol) dieser PCR-Produkte können bei Verschleppung ins Probenmaterial, in die Reagenzien zur Bisulfitbehandlung oder die PCR-Reagenzien dieses Kits zu einem falschen Ergebnis führen.

Ein sauberer und gut strukturierter Arbeitsablauf ist daher von entscheidender Bedeutung, um falschen Ergebnissen vorzubeugen. Dazu ist es erforderlich die Laborbereiche für Prä- und Post-PCR voneinander zu trennen. In jedem Bereich sollten separate Ausrüstung, Verbrauchsmaterialien, Laborkittel und Handschuhe vorhanden sein. Überführen Sie niemals Laborkittel, Handschuhe oder Equipment von einem Bereich in einen anderen. Die nachstehende Abbildung 4 zeigt beispielhaft eine Aufteilung eines Labors in zwei separate Räume. Ein Bereich ist nur für die Bisulfitbehandlung und zum Ansetzen der PCR-Reaktionen bestimmt und im anderen Bereich erfolgt die Durchführung der PCR.

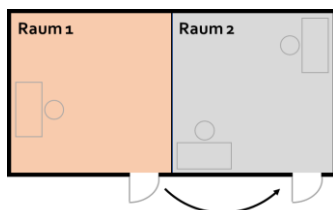


Abbildung 4 Raumaufteilung

In Raum 1 wird die Bisulfitbehandlung der Proben sowie die komplette PCR-Vorbereitung (optimal ist die Verwendung einer PCR-Hood) durchgeführt. In Raum 2 wird die PCR durchgeführt, detektiert und ausgewertet.

9.3. Vermeidung von Kontaminationen

- Laborkittel und Einmalhandschuhe müssen bei allen Arbeitsschritten getragen werden.
- Einmalhandschuhe sind häufig und immer nach einer (vermuteten) Kontamination mit Reagenzien oder Probenmaterial zu wechseln.
- Alle Arbeitsflächen, Geräte und Hilfsmittel müssen mit einer geeigneten Reinigungslösung (DNA-zerstörende Agenzien) dekontaminiert werden.
- Berühren Sie nicht die Innenseiten der Reaktionsgefäße oder deren Deckel.
- Beim Pipettieren sind grundsätzlich Filterspitzen (frei von DNase, RNase und humaner DNA) zu verwenden, um Kreuzkontaminationen durch beim Pipettieren entstehende Aerosole auszuschließen. Die Pipettenspitzen sollten zwischen den Pipettierschritten stets gewechselt werden.
- Es ist wichtig Negativkontrollen mitzuführen, um mögliche Kontaminationen zu erkennen.

9.4. Anleitung zur Handhabung

- Bewahren Sie die unbenutzten Komponenten bis zur Verwendung in der Originalverpackung auf.
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.
- Der Arbeitsablauf kann nach der Bisulfitbehandlung unterbrochen werden. Die Proben können an dieser Stelle eine Woche bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu zwei Monate bei -15 °C bis -30 °C aufbewahrt werden.
- Berühren Sie nicht die Unterseite der farbigen, gewölbten PCR-Deckel-Streifen beim Abziehen von den PCR-Streifen und entsorgen Sie diese fachgerecht.
- Die GynTect® Strips und GynTect® Caps sind während der gesamten Durchführung nicht ohne Einmalhandschuhe zu berühren, da sonst unspezifische Fluoreszenzsignale auftreten können.
- Beschriften Sie die GynTect® Strips und GynTect® Caps nicht an falschen Positionen, da sonst unspezifische Fluoreszenzsignale auftreten können.
- Die GynTect® Strips und GynTect® Caps sind für den Einmalgebrauch bestimmt und können nicht wiederverwendet werden.
- Bewahren Sie die unbenutzten GynTect® Strips und GynTect® Caps in der Originalverpackung auf.

10. ENTSORGUNG

Das unbenutzte GynTect® Kit und dessen Komponenten können ohne weitere besondere Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Patientenproben und benutzte Reaktionsgefäße sind wie infektiöser Abfall zu handhaben. Alle Reagenzien sind den national und regional gesetzlichen Vorschriften entsprechend zu entsorgen.

11. GYNTECT® VERFAHREN

Das folgende Kapitel enthält eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Arbeitsschritte von der Probenentnahme bis hin zur Auswertung der Daten. Das GynTect® Kit GT003-10 enthält jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle für genau eine GynTect® Durchführung, alle zehn Proben müssen daher in einem Arbeitsablauf bearbeitet werden.

11.1. Arbeitsablauf

Insgesamt ist GynTect® in weniger als 4 Stunden durchführbar, die aktive Arbeitszeit beträgt ca. 2 Stunden. Bei der ersten GynTect® Durchführung sollten noch 15 Minuten zur Erstellung des PCR-Templates eingeplant werden.

Details über den Arbeitsablauf sind der Abbildung 5 zu entnehmen.

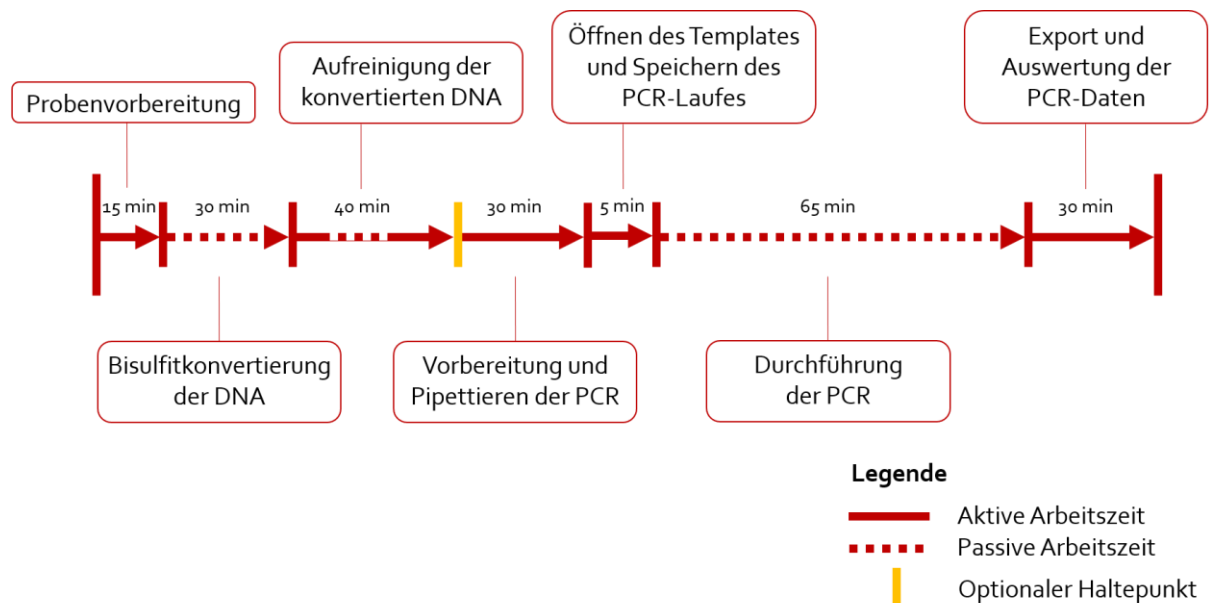


Abbildung 5 Zeitstrahl des Arbeitsablaufes von GynTect®

11.2. Probenentnahme

Das Probenentnahme-Set ist nicht Teil des GynTect® Kits. ThinPrep® PreservCyt®-Probenröhrchen (Hologic, Inc.) und Cervex-Brush® Probenentnahmegерäte (Rovers Medical Devices) sind bei den jeweiligen Herstellern erhältlich. Die Entnahme einer Zervikalprobe durch den Arzt erfolgt laut Herstellerangaben und unter Einhaltung der allgemeingültigen Richtlinien zur Entnahme einer zervikalen Abstrichprobe [7].

Wichtig: Der Bürstenkopf des Probenentnahmegерätes sollte nach der Entnahme nicht im Probengefäß verbleiben, da sonst die Performance von GynTect® beeinträchtigt wird.

Als Abstrichmedium muss ThinPrep® PreservCyt® Solution verwendet werden. Die Verwendung anderer Probenmedien war nicht Teil der Validierung des GynTect® Assays.

Eine gute Qualität der eingesetzten DNA-Probe ist eine wichtige Voraussetzung für die Aussagekraft des Assays. Daher muss beachtet werden, dass eine nicht ordnungsgemäße Probenentnahme, Bisulfitbehandlung und DNA-Lagerung zu nicht validen oder gegebenenfalls sogar falsch negativen Ergebnissen führen kann.

Zervikalproben können ohne Kühlung bis zur Durchführung des Tests in das Laboratorium transportiert werden. Die Lagerung der Proben ist bis zu 1,5 Jahre bei einer Temperatur von +2 °C bis +30 °C möglich.

11.3. Probenvorbereitung

Die folgenden Schritte müssen im Probenvorbereitungsbereich (Raum 1) durchgeführt werden.

Wichtig: Befindet sich der Bürstenkopf des Probenentnahmegerätes im Probengefäß, so wird dieser zunächst entfernt und verworfen.

1. Vortexen Sie alle Patientenproben 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und überführen Sie sofort 1 ml Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß.

Achtung: Die Zellen setzen sich sehr schnell wieder auf dem Boden des Gefäßes ab. Zwischen Durchmischen der Patientenprobe und der 1 ml-Entnahme dürfen nicht mehr als 10 Sekunden liegen!

2. Zentrifugieren Sie die Proben **5 min** bei **10.000 xg**.
3. Nehmen Sie vorsichtig 900 µl Überstand über dem Pellet ab, ohne das Pellet zu zerstören.

Achtung: Je nach Beschaffenheit der Probe ist das Pellet mehr oder weniger fest.

4. Resuspendieren Sie das Pellet durch Vortexen für 3 Sekunden. 40 µl der resuspendierten Probe werden in die Bisulfitbehandlung eingesetzt.

11.4. Bisulfitbehandlung der Proben

Das Bisulfit-Kit ist nicht Teil des GynTect® Kits. Das GynTect® Assays wurde mit dem EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) von Qiagen validiert.

Achtung: Das Original-Protokoll des EpiTect® Fast Bisulfite Kits von Qiagen wurde modifiziert. Die Verwendung dieses modifizierten Protokolls ist eine Voraussetzung dafür die angegebenen Leistungsmerkmale des GynTect® Assays zu erfüllen.

11.4.1. Bisulfitkonvertierung der DNA

1. Bereiten Sie die zu verwendenden Puffer des Bisulfit-Kits nach Tabelle 5 vor.

Wichtig: Der **Buffer BL** wird ohne *Carrier RNA* verwendet. Der **Buffer BL** kann durch zu kühle Lagerung bzw. Transport ausfallen. Sollte eine Fällung der Lösung zu beobachten sein, schütteln und erwärmen Sie den **Buffer BL** auf 37 °C, bis dieser wieder vollständig gelöst ist.

Tabelle 5 Vorbereitung der Puffer des EpiTect® Fast Bisulfite Kits (Qiagen)

Puffer	Zugabe Ethanol	Lagerungstemperatur
Buffer BL *	-	Raumtemperatur
Buffer BW	30 ml Ethanol (96 - 100 %)	Raumtemperatur
Buffer BD	27 ml Ethanol (96 - 100 %)	2 °C bis 8 °C

* Keine *Carrier RNA* hinzufügen, Kontrolle der Beschaffenheit der Lösung (siehe Hinweis)

2. Stellen Sie für jede Probe einen Ansatz für die Bisulfitkonvertierung in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß gemäß Tabelle 6 her.

Wichtig: Die **Bisulfite Solution** kann durch zu kühle Lagerung bzw. Transport ausfallen. Sollte eine Fällung der Lösung zu beobachten sein, schütteln und erwärmen Sie die **Bisulfite Solution** auf 37 °C, bis diese wieder vollständig gelöst ist.

Tabelle 6 Ansatz für die Bisulfite-Reaktion

Komponente	pro Reaktion
Bisulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Vorbereitete resuspendierte Probe	40 µl
Gesamtvolumen pro Reaktion	140 µl

* Kontrolle der Beschaffenheit der Lösung (siehe Hinweis)

Achtung: Die **Bisulfite Solution** ist nach dem Öffnen nicht lagerfähig. Eine **Bisulfite Solution** darf daher nur für einen Aufarbeitungsprozess verwendet werden, der Rest wird verworfen.

3. Vortexen Sie den Ansatz für die Bisulfite-Reaktion 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit, zentrifugieren Sie diesen ab und belassen Sie diesen bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur.

Achtung: Der **DNA Protect Buffer** schlägt bei korrektem pH-Wert von grün zu blau um. Die Probe muss innerhalb von 1 Stunde weiterverarbeitet werden.

4. Nutzen Sie einen Thermocycler mit beheizbarem Deckel (100 °C) und programmieren Sie diesen gemäß Tabelle 7.

Wichtig: Ist das Reaktionsvolumen (140 µl) am Thermocycler nicht einstellbar, wählen Sie das nächstmögliche Volumen aus. Der Deckel des Cyclers muss vor dem Start der Konvertierung nicht vorgeheizt werden.

Tabelle 7 Bisulfite-Reaktion im Thermocycler

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 Minuten	95 °C
Inkubation	10 Minuten	60 °C
Denaturierung	5 Minuten	95 °C
Inkubation	10 Minuten	60 °C
Lagerung	Halten*	20 °C

* Konvertierte DNA kann über Nacht (max. 16 Stunden) im Thermocycler oder bei Raumtemperatur verbleiben.

5. Platzieren Sie die 0,5 ml Reaktionsgefäße im Thermocycler und starten Sie die Inkubation.

Achtung: Die Proben aus dem Thermocycler können über Nacht (max. 16 Stunden) bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Proben keinesfalls bei 2 °C - 8 °C lagern, da diese sonst ausfallen und die Aufarbeitung nicht mehr möglich ist.

11.4.2. Aufreinigung der konvertierten DNA

6. Vortexen Sie die Proben nach der Bisulfitkonvertierung 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie diese ab.

7. Geben Sie **310 µl Buffer BL** auf die MinElute® Spin Column.

Wichtig: Beschriften Sie die MinElute® Spin Column eindeutig.

8. Fügen Sie die Probe (140 µl) hinzu und mischen alles durch 5 × auf- und ab-pipettieren.

Wichtig: Berühren Sie nicht mit der Pipettenspitze die Membran in der Säule und vermeiden Sie die Entstehung von Blasen. Überprüfen Sie, ob die Lösung nach fünfmaligem Pipettieren schlierenfrei ist.

9. Fügen Sie **250 µl Ethanol** (96 - 100 %) hinzu, verschließen Sie den Deckel der Säule und mischen Sie die Flüssigkeit durch manuelles Über-Kopf-Kippen der Säule (180 °). Wiederholen Sie diesen Vorgang 5 ×.

10. Zentrifugieren Sie die Säule 30 Sekunden bei 18.000 ×g und überprüfen Sie, ob die Flüssigkeit aus der Säule im Collection-Tube ist.

11. Entnehmen Sie die Säule aus der Zentrifuge, werfen Sie den gesamten Durchfluss und platzieren Sie die Säule wieder im Collection-Tube.

12. Pipettieren Sie zum Waschen **200 µl Buffer BW** auf die Säule und zentrifugieren Sie diese 30 Sekunden bei 18.000 ×g.

13. Geben Sie **200 µl Buffer BD** auf die Säule, verschließen Sie den Deckel und inkubieren Sie diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

14. Zentrifugieren Sie die Säule 30 Sekunden bei 18.000 ×g.

15. Fügen Sie **200 µl Buffer BW** hinzu und zentrifugieren Sie 30 Sekunden bei 18.000 ×g.

16. Nehmen Sie die Säule aus der Zentrifuge und werfen Sie den gesamten Durchfluss.

17. Waschen Sie die Säule mit **400 µl Buffer BW** und zentrifugieren Sie diese 30 Sekunden bei 18.000 ×g.

18. Geben Sie **200 µl Ethanol** (96 - 100 %) auf die Säule und zentrifugieren Sie diese 30 Sekunden bei 18.000 ×g.

19. Setzen Sie die Säule in ein neues 2 ml Collection-Tube und zentrifugieren Sie diese 60 Sekunden bei 18.000 ×g.

Achtung: Durch Überspringen bzw. Weglassen dieses Schrittes wird das Ergebnis des GynTect® Assays, auf Grund von Ethanol-Resten im Eluat, negativ beeinflusst.

20. Anschließend setzen Sie die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß um und pipettieren Sie **20 µl Wasser** direkt auf die Membran.

Wichtig: Berühren Sie nicht mit der Pipettenspitze die Membran der Säule. Pipettieren Sie die Elutionslösung nicht an den Rand der Säule.

21. Nach 60 Sekunden Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugieren Sie die Säule 60 Sekunden bei 8.000 ×g (Elution).

22. Führen Sie eine visuelle Kontrolle des Eluat-Volumens durch.

Optionaler Haltepunkt: Die Proben können an dieser Stelle eine Woche bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 2 Monate bei - 15 °C bis - 30 °C aufbewahrt werden!

11.5. PCR

Vor dem Ansetzen der PCR sollte sichergestellt sein, dass das PCR-Temperaturprotokoll an dem entsprechenden Real-Time PCR-Gerät einprogrammiert ist, um die Zeit bis zum PCR-Start möglichst kurz zu halten. Verfahren Sie für das Programmieren des PCR-Templates am cobas z 480 Analyzer wie ab Seite 19 beschrieben. Die Erläuterung für die PCR am CFX96 Real-Time PCR Detection System finden Sie ab Seite 22.

11.5.1. Vorbereitung und Pipettieren der PCR

Wichtig: Die Vorbereitung und das Pipettieren der PCR sollten nicht länger als 60 Minuten dauern. Dieser Schritt wird in Raum 1 (Prä-PCR-Bereich) des Labors durchgeführt.

Beachten Sie die vorgegebene Plattenbelegung, wie auf Seite 19 bzw. Seite 22 beschrieben. Die Positivkontrolle (PC) ist in Reihe 11 und die Negativkontrolle (NTC) in Reihe 12 zu positionieren.

1. Fügen Sie jedem Proben-Eluat **70 µl GynTect® Water** hinzu.
2. Vortexen Sie die Probe 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie sie ab.
3. Entnehmen Sie aus dem Kit den **GynTect® Mastermix**, für jede Probe einen **GynTect® Strip** (grüner Deckel), für die Positivkontrolle einen **GynTect® Strip** (roter Deckel) und für die Negativkontrolle einen **GynTect® Strip** (gelber Deckel).
4. Setzen Sie die **GynTect® Strips** auf ein PCR-Rack. Beachten Sie dabei die korrekte Ausrichtung der **GynTect® Strips** (siehe Abbildung 6).

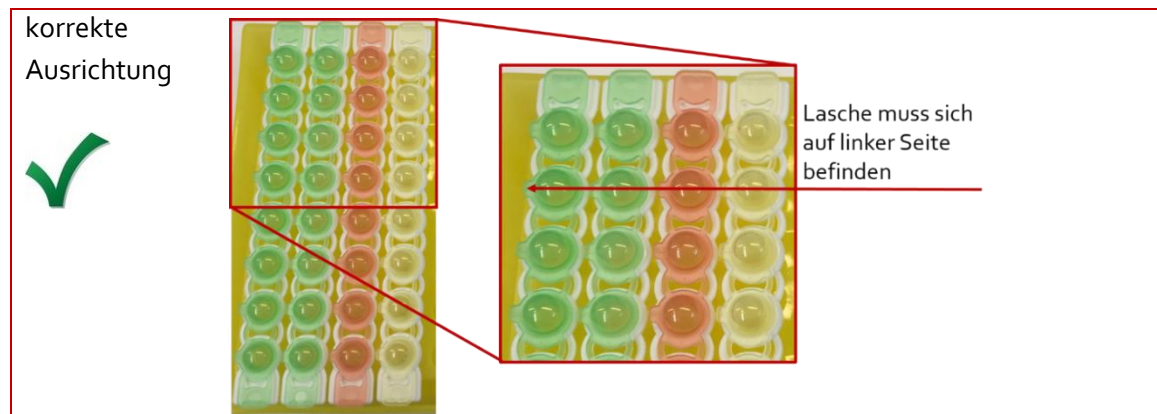


Abbildung 6 Ausrichtung der GynTect® Strips

5. Vortexen Sie den **GynTect® Mastermix** 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie diesen ab.
6. Ziehen Sie die gewölbten PCR-Deckel-Streifen von den **GynTect® Strips** ab und werfen Sie diese.
7. Geben Sie pro Well des **GynTect® Strips** **10 µl des GynTect® Mastermixes** hinzu.

Hinweis: Es ist eine Blaufärbung zu beobachten. Diese dient der Sichtkontrolle und hat keinen Einfluss auf das GynTect® Ergebnis.

Wichtig: Wechseln Sie die Pipettenspitze für jedes Well, da die **GynTect® Strips** die für die PCR benötigten Primer bereits enthalten.

8. Fügen Sie in jedes der acht Wells eines **GynTect® Strips** **10 µl Probe** hinzu.

Wichtig: Wechseln Sie die Pipettenspitze für jedes Well.

Hinweis: Bewahren sie den Rest der Proben-Eluate für eine ggf. benötigte Wiederholung der GynTect® PCR auf.

9. Verschließen Sie die einzelnen **GynTect® Strips** sofort nach dem Pipettivorgang mit den flachen, durchsichtigen **GynTect® Caps**.

Achtung: Berühren Sie nicht die Innenseite der **GynTect® Strips** und **GynTect® Caps**. Achten Sie darauf, dass die **GynTect® Caps** nach Verschließen richtig auf den **GynTect® Strips** sitzen. Die Überprüfung erfolgt am besten durch seitliche Sichtkontrolle.

10. Vortexen Sie die **GynTect® Positive Control** 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie diese ab.

11. Fügen Sie in jedes der acht Wells des **GynTect® Strips** für die Positivkontrolle **10 µl GynTect® Positive Control** und in jedes der acht Wells des **GynTect® Strips** für die Negativkontrolle **10 µl GynTect® Water** hinzu.

12. Verschließen Sie die einzelnen **GynTect® Strips** sofort nach dem Pipettivorgang mit den flachen, durchsichtigen **GynTect® Caps**.

Achtung: Berühren Sie nicht die Innenseite der **GynTect® Strips** und **GynTect® Caps**. Achten Sie darauf, dass die **GynTect® Caps** nach Verschließen richtig auf den **GynTect® Strips** sitzen. Die Überprüfung erfolgt am besten durch seitliche Sichtkontrolle.

13. Beschriften Sie alle **GynTect® Strips** eindeutig nach Abschluss der Pipettierarbeiten auf den neuen **GynTect® Caps** (siehe Abbildung 7).

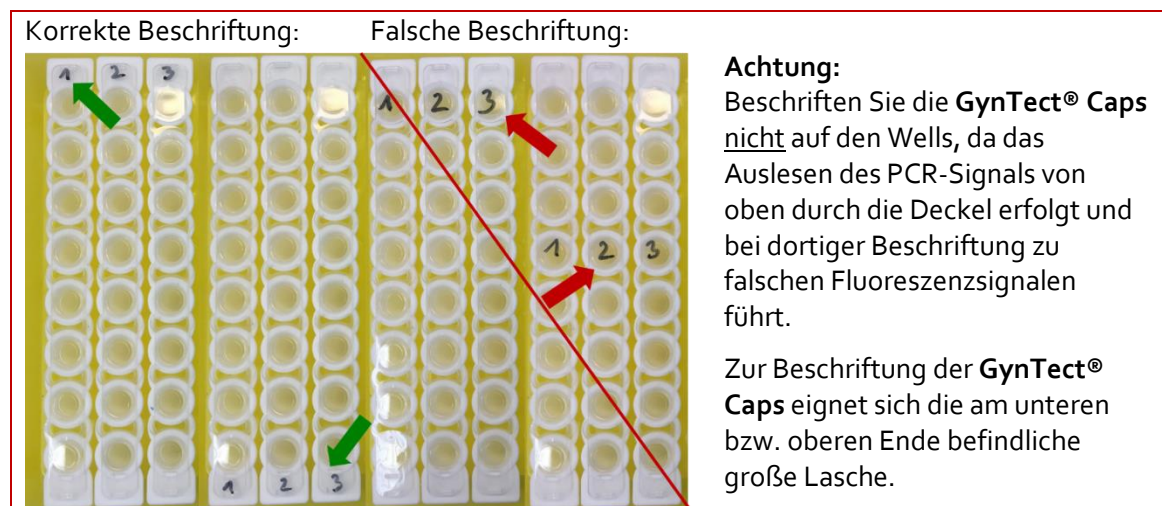


Abbildung 7 Beschriftung GynTect® Strips

14. Vortexen Sie alle verschlossenen **GynTect® Strips** 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie diese ab.

11.5.2. Durchführung der PCR am cobas z 480 Analyzer

Im Folgenden wird die Durchführung von GynTect® an den Real-Time PCR-Systemen cobas z 480 Analyzer (blau markiert) bzw. CFX96 Real-Time PCR Detection Systemen (grün markiert) beschrieben. Beachten Sie hierbei aber immer die Herstelleranleitungen zur Bedienung der PCR-Geräte.

Die PCR ist in Raum 2 durchzuführen.

11.5.2.1. Erstellung eines PCR-Templates

Falls Sie zu einem früheren Zeitpunkt das PCR-Template erstellt und gespeichert haben, können Sie unter 11.5.2.2 *Starten des PCR-Laufes* fortfahren.

1. Schalten Sie das PCR-Gerät und den dazugehörigen Computer ein. Innerhalb von 15 Sekunden muss am Computerbildschirm im BIOS „User defined Workflow“ gewählt werden, um in einen frei programmierbaren Geräte-Modus zu wechseln.
2. Wählen Sie *New Experiment*, um ein neues Template zu erstellen. Stellen Sie das *Detection Format* auf SYBR Green 1 / HRM Dye und setzen Sie das *Reaction Volume* auf 20 µl. Programmieren Sie im Reiter *Run Protocol* das Temperatur-Profil gemäß Tabelle 8.

Tabelle 8 PCR-Temperatur-Profil am 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
			66 °C	Single	00:00:35	2.2
Melt curve	1 x	Melting Curves	95 °C	None	00:00:15	4.4
			60 °C	None	00:00:20	2.2
			95 °C	Continuous	-	0.11
Cooling	1 x	None	37 °C	None	00:01:00	2.2

3. Speichern Sie das *Run-Template* unter dem Namen *GynTect* ab.

11.5.2.2. Starten des PCR-Laufes

Wenn Sie zu einem früheren Zeitpunkt das PCR-Template gespeichert haben, können Sie es nun aufrufen. Überprüfen Sie, dass das korrekte Temperaturprotokoll eingestellt ist.

1. Erstellen Sie im *Subset Editor* je nach gewählter Plattenbelegung ein *Subset-Template* (Beispiele in Abbildung 8 bzw. Abbildung 9).

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

Abbildung 8 Beispiel Plattenlayout für 6 Patientenproben

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

Abbildung 9 Beispiel Plattenbelegung für 10 Patientenproben unter Verwendung des GynTect® Kits GT003-10

Wichtig: Die Plattenbelegung ist **nicht** variabel. Die Positivkontrolle (PC) ist in Reihe 11 und die Negativkontrolle (NTC) in Reihe 12 zu positionieren.

- Definieren Sie im *Sample Editor* die Probenbeschriftung.
- Stellen Sie die **GynTect® Strips** senkrecht in definierter Reihenfolge in das PCR-Gerät.

Wichtig: Verwenden Sie den Einsatz/Träger für PCR-Streifen (erhältlich bei der Roche Diagnostics GmbH).

- Speichern Sie den PCR-Lauf durch Betätigen des „Disketten“-Buttons (rechts in der Aktionsleiste) unter einem eindeutigen Namen ab und starten Sie den PCR-Lauf durch Betätigen des Buttons *Start Run* im Reiter *Run Protocol (Experiment Editor)*.

11.5.2.3. Export der Daten

Falls Sie die Auswertung des PCR-Laufes direkt an dem zum cobas z 480 Analyzer zugehörigen Rechner durchführen, können Sie unter 11.5.2.4 *Auswerteeinstellung in der Geräte-Software* fortfahren.

Exportieren Sie nach Beendigung der PCR (Run complete) den PCR-Lauf über  „Export“ und speichern Sie die Datei an einem gewünschten Ort ab

11.5.2.4. Auswerteeinstellung in der Geräte-Software

Falls Sie den Export des PCR-Laufes durchgeführt haben, starten Sie an einem weiteren Computer die LightCycler® 480 Software und öffnen/importieren Sie den PCR-Lauf. Anderenfalls führen Sie die Einstellungen am Rechner des cobas z 480 Analyzers durch.

1. Wählen Sie im *Analysis Editor* den Auswerte-Algorithmus *Abs Quant/Fit Points* und das festgelegte *Subset*.
2. Stellen Sie im Reiter *Cycle Range* folgende Parameter ein: *First Cycle* 1, *Last Cycle* 42 sowie den *Background* auf 5 bis 20, indem ein *Min Offset* von 4 und ein *Max Offset* von 19 gewählt wird.
3. Überprüfen Sie im Reiter *Noise Band*, dass der *STD Multiplier* auf 12 eingestellt ist und die *Noise Band* automatisch berechnet wird.
4. Stellen Sie im Reiter *Analysis* den *Threshold* auf 0,5 und überprüfen Sie, dass die Anzahl der *Fit Points* auf 2 eingestellt ist.
5. Betätigen Sie den Button *Calculate* um die Analyse durchzuführen. Exportieren Sie die Datentabelle über *Export Table* mittels Rechtsklick als .txt-Datei und speichern Sie diese unter einem eindeutigen Namen ab.
6. Gehen Sie zurück zum *Analysis Editor* und wählen Sie den Auswerte-Algorithmus *Tm Calling* und gegebenenfalls das festgelegte *Subset*.
7. Wählen Sie neben *Tm* zusätzlich *Height* an und betätigen Sie den Button *Calculate*, um die Analyse durchzuführen. Exportieren Sie die Datentabelle über *Export Table* mittels Rechtsklick als .txt-Datei und speichern Sie diese unter einem eindeutigen Namen ab.

In Kapitel 11.6 wird die Auswertung und Interpretation der PCR-Daten beschrieben.

11.5.3. Durchführung der PCR am CFX96 Real-Time PCR Detection System

Beachten Sie immer die Herstelleranleitungen zur Bedienung der PCR-Geräte.

Die PCR ist in Raum 2 durchzuführen.

11.5.3.1. Erstellen eine PCR-Templates

1. Schalten Sie das PCR-Gerät an.
2. Programmieren Sie das PCR-Temperaturprotokoll wie in nachstehender Tabelle 9 beschrieben, indem Sie die Temperaturschritte bzw. Zeiten anwählen und bearbeiten.

Tabelle 9 PCR-Temperaturprotokoll** am CFX96 Real-Time Detection PCR System

Programme Name	Step	Number of cycles	Temperature	Time (m:ss)
Initialization	1	1 x	94 °C	1:00
Amplification	2	42 x	94 °C	0:15
	3*		66 °C	0:35
	4		GO TO Step 2	41 x
Melt Curve	5	1 x	95 °C	0:15
	6*	1 x	65 °C	0:05
			95 °C	0.5 °C/cycle
Cooling	5	1 x	37 °C	1:00

* Bei Step 3 und Step 6 erfolgt die Detektion „Plate Read“ des Fluoreszenzsignals, welches über das Kamerasymbol symbolisiert wird.

** Am CFX96 Real-Time PCR Detection System beträgt die Ramp Rate standardmäßig 5°C/sec. Mit dieser Einstellung wurde dieser IVD-Test validiert.

3. Setzen Sie das Reaktionsvolumen auf 20 µl und stellen Sie die Temperatur der Deckelheizung Lid bei 105 °C.
4. Speichern Sie das PCR-Template unter dem Namen *GynTect* ab.

11.5.3.2. Starten des PCR-Laufes

Wenn Sie zu einem früheren Zeitpunkt das PCR-Template gespeichert haben, können Sie es nun aufrufen. Überprüfen Sie, dass das korrekte Temperaturprotokoll eingestellt ist.

1. Platzieren Sie die GynTect® Strips im PCR-Gerät, indem Sie diese vertikal in die kleinen Vertiefungen des Heizblockes einsetzen. Wählen Sie ein geeignetes Plattenlayout (siehe Abbildung 10 bzw. Abbildung 11).

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

Abbildung 10 Beispiel Plattenlayout für 6 Patientenproben

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

Abbildung 11 Beispiel Plattenbelegung für 10 Patientenproben unter Verwendung des GynTect® Kits GT003-10

Wichtig: Die Plattenbelegung ist nicht variabel. Die Positivkontrolle (PC) ist in Reihe 11 und die Negativkontrolle (NTC) in Reihe 12 zu positionieren.

- Benennen Sie den Lauf unter einem geeigneten Dateinamen. Beachten Sie, dass SYBR/FAM only detektiert wird, bevor Sie den Lauf starten.

11.5.3.3. Export der Daten

Nach Beendigung der PCR, exportieren Sie den PCR-Lauf (.pcrd Datei).

11.5.3.4. Auswerteeinstellungen in der Geräte-Software

- Öffnen Sie an einem Computer die Bio-Rad CFX Software und stellen Sie zunächst unter *User* → *User Preferences* → *Plate* den *Plate Type: BR White* ein, um die Verwendung von weißer Plastik anzugeben.
- Importieren Sie die .pcrd-Datei.
- Definieren Sie unter *Plate Setup* → *View/Edit Plate* das Plattenlayout. Unter *Sample Names* tragen Sie die Probenbezeichnung ein. Nicht belegte Positionen werden markiert und durch Setzen des Häkchens bei *Exclude Wells in Analysis* aus der Auswertung rausgerechnet. Mit *OK* bestätigen Sie die Plattenbelegung.
- Stellen Sie unter *Settings* folgende Auswerteeinstellungen (siehe Tabelle 10) ein.

Tabelle 10 Auswerteeinstellungen am CFX96 Real-Time PCR Detection System

Parameter	Einstellung
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

5. Wählen Sie unter dem Reiter *Custom Data View* → *Load a Preset View* → *Amplification + Melt*. Setzen Sie den Threshold im *Melt Peaks Chart* manuell auf „Null“ („Drag-and-Drop“).
6. Für den Export der PCR-Daten wählen sie im Reiter *Export* → *Custom Export* folgende Einstellungen:
 - Format: Excel 2007 (*.xlsx)
 - Data to Export → folgende Haken setzen
(*Include Run Information Header, Well, Fluorophore, Target Name, Content, Sample Name, Cq, Melt Temperature, Melt Peak Height*)

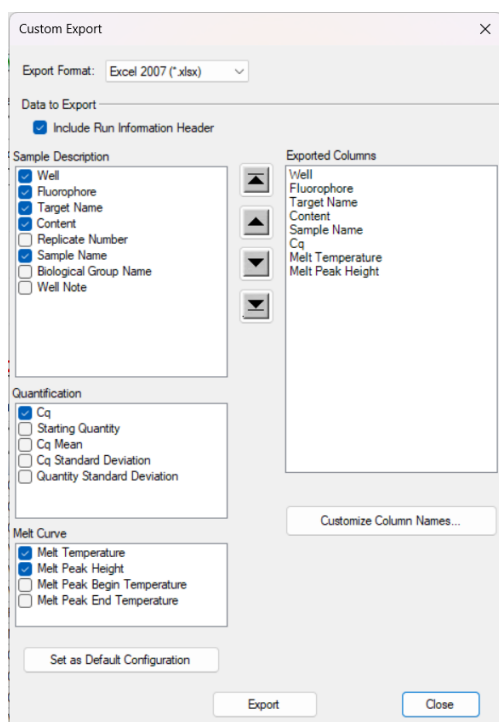


Abbildung 12 Custom Export

7. Betätigen Sie den *Export*-Button und speichern Sie die .xlsx-Datei unter einem eindeutigen Namen ab.

11.6. Auswertung und Interpretation der PCR-Daten

Nachfolgend wird die Auswertung der exportierten PCR-Daten beschrieben.

1. Öffnen Sie ein geeignetes Tabellenkalkulationsprogramm und kopieren Sie die exportierten PCR-Daten hinein.
2. Formatieren Sie die Daten so um, dass alle Ergebnisse für ein Probe untereinander und alle Proben nebeneinander dargestellt werden.

	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5		Probe 6		PC		NTC	
Marker	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
ASTN1	37,42	82,99	35,62	84,44	38,76	82,74			31,81	83,58	36,51	83,41	28,42	84,55		
DLX1	33,29	81,43	33,33	81,77	30,54	80,46	34,85	81,92	30,55	81,55	38,30	81,61	28,80	82,75		
ITGA4			39,66	80,75					35,82	81,30			28,19	82,84		
RXFP3					36,77	81,47			33,52	82,68			27,80	82,43		
SOX17			36,87	85,01	39,51	82,86			39,16	82,36			31,19	85,07		
ZNF671	37,50	84,78							29,47	82,98		84,24	27,52	86,08		
ACHE	25,54	79,52	25,58	79,88	23,50	79,70	26,63	79,90	24,77	79,76	29,12	79,80	25,58	80,47		74,47
IDS-M	26,36	80,56	26,49	81,18	24,13	80,78	26,77	80,49	25,55	80,34	29,31	81,42	30,45	86,18		

Überprüfung der Validität des PCR-Laufes

3. Der PCR-Lauf ist **valide**, wenn Positiv- und Negativkontrolle folgende Kriterien (siehe Tabelle 11) einhalten.

Tabelle 11 Validitätskriterien für die GynTect® Kontrollen

Marker	Positivkontrolle			Negativkontrolle
	Ct-Wert	Schmelztemperatur-Intervall (cobas)	Schmelztemperatur-Intervall (CFX)	
ASTN1	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 86 °C	78 °C – 86 °C	Kein Wert*
DLX1	≥ 20, ≤ 38	79 °C – 85 °C	77 °C – 85 °C	Kein Wert*
ITGA4	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Kein Wert*
RXFP3	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Kein Wert*
SOX17	≥ 20, ≤ 38	81 °C – 87 °C	79 °C – 87 °C	Kein Wert*
ZNF671	≥ 20, ≤ 38	80 °C – 87 °C	78 °C – 87 °C	Kein Wert*
ACHE	≥ 20, ≤ 38	78 °C – 83 °C	76 °C – 83 °C	Kein Wert*
IDS-M	≥ 20, ≤ 38	78 °C – 88 °C	76 °C – 88 °C	Kein Wert*

* **Achtung:** Wenn doch ein Ct-Wert für die Negativkontrolle detektiert wird, darf dieser keine Marker-spezifische Schmelztemperatur zeigen.

Überprüfung der Validität und Positivität der Probe

4. Das Ergebnis für die Patientenprobe ist **valide**, wenn die Kontrollmarker ACHE und IDS-M folgende Kriterien (siehe Tabelle 12) einhalten.

Tabelle 12 Validitätskriterien für die Kontrollmarker für Patientenproben

Marker	Ct-Wert	Schmelztemperatur-Intervall (cobas)	Schmelztemperatur-Intervall (CFX)
ACHE	$\geq 20, \leq 42$	78 °C - 83 °C	76 °C - 83 °C
IDS-M	$\geq 20, \leq 32$	78 °C - 88 °C	76 °C - 88 °C

- Wird ein **Ct-Wert** > 0 , < 20 mit einer Schmelztemperatur im spezifischen Bereich generiert, wird das GynTect® Ergebnis für diese Probe **invalide** gewertet.
- Für **valide** Proben, welche für Methylierungsmarker mit einem Ct-Wert und einer Schmelztemperatur im definierten Intervall (siehe Tabelle 13) detektiert werden, wird ein ΔCt -Wert nach folgender Gleichung berechnet:

Berechnung ΔCt

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{(\text{Marker x})} - \text{Ct}_{(\text{IDS-M})}$$

Die Ergebnisse für die Methylierungsmarker werden **positiv** bewertet, wenn die **ΔCt -Werte** die in Tabelle 13 angegebenen Werte erreichen.

Tabelle 13 Positivitätskriterien für die Methylierungsmarker für Patientenproben

Marker	Ct-Wert	Schmelztemperatur-Intervall (cobas)	Schmelztemperatur-Intervall (CFX)	ΔCt -Wert
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 86 °C	78 °C - 86 °C	$\leq 8,00$
DLX1	$\geq 20, \leq 42$	79 °C - 85 °C	77 °C - 85 °C	$\leq 9,00$
ITGA4	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	$\leq 9,00$
RXFP3	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	$\leq 9,00$
SOX17	$\geq 20, \leq 42$	81 °C - 87 °C	79 °C - 87 °C	$\leq 9,00$
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 87 °C	78 °C - 87 °C	$\leq 10,00$

Wichtig: Untersuchen Sie die Amplifikations- und Schmelzkurven auf widersprüchliche Datenpunkte oder Verläufe und bewerten Sie Proben mit auffälligen Kurvenverläufen invalide.

Bewertung des GynTect® Assays

- Für die Bewertung des GynTect® Assays werden die folgenden Markerwerte (siehe Tabelle 14) für die positiven Einzelmarker vergeben und für die sechs Methylierungsmarker aufsummiert:

Tabelle 14 Wertung der GynTect® Marker

Marker	Positives Einzelmarkerergebnis	Negatives Einzelmarkerergebnis
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Ist die **Summe** aller Markerwerte **größer oder gleich 6**, so ist **GynTect®** als **positiv** zu bewerten.

Ist die **Summe** aller Markerwerte **kleiner oder gleich 5**, so ist **GynTect®** als **negativ** zu bewerten.

Ein positives GynTect® Testergebnis korreliert mit dem Vorhandensein einer zervikalen, intraepithelialen Neoplasie oder eines Zervixkarzinoms. GynTect® ist nicht als letzte Therapieentscheidung einzusetzen und in Verbindung mit anderen ärztlichen Befunden auszuwerten.

12. LEISTUNGSMERKMALE VON GYNTECT®

Die hier gezeigten Leistungsdaten wurden am cobas z 480 Analyzer erhoben.

12.1. Analytische Leistungsbewertung

12.1.1. Analytische Sensitivität – Detektion methylierter DNA

Die analytische Sensitivität des PCR-Assays wurde unter Verwendung von methylierter, Bisulfit-konvertierter genomischer Human-DNA ermittelt. Die jeweiligen Nachweisgrenzen sind in der folgenden Tabelle 15 aufgeführt. Die Verdünnungsreihen wurden in drei unterschiedlichen Versuchen im Triplikat getestet. Bei einem Abstrich werden im Durchschnitt 20 – 50 ng DNA in den Assay eingesetzt.

Tabelle 15 Analytische Sensitivität des PCR-Assays – Teil 1

Eingesetzte DNA	Ungefähre Anzahl Zellen im Assay *	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0,2 ng	30 Zellen	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 Zellen	9 / 9	9 / 9	9 / 9	8 / 8	8 / 8	9 / 9
0,05 ng	7,5 Zellen	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	5 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 Zellen	7 / 9	8 / 9	6 / 9	9 / 9	6 / 9	8 / 9
0,01 ng	1,5 Zellen	5 / 9	5 / 9	6 / 9	8 / 9	5 / 9	6 / 9
0,005 ng	< 1 Zelle	8 / 9	7 / 9	4 / 9	6 / 9	1 / 9	6 / 9
0,002 ng	< 1 Zelle	3 / 9	3 / 9	1 / 9	2 / 9	0 / 9	1 / 9

* eine Zelle enthält ca. 6 - 7 pg genomische DNA

Die Nachweisgrenze für die Methylierungsmarker liegt bei insgesamt 15 Zellen (0,1 ng) in der Gesamtprobe.

Zudem wurde ein DNA-Gemisch aus methylierter, Bisulfit-konvertierter genomischer Human-DNA und unmethylierter, Bisulfit-konvertierter genomischer Human-DNA getestet. Dabei wurden jeweils 20 ng DNA bzw. 100 ng DNA pro Assay eingesetzt. Die Verdünnungsreihen wurden in unterschiedlichen Versuchen im Triplikat getestet (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16 Analytische Sensitivität des PCR-Assays – Teil 2

Anteil methylierte DNA	Eingesetzte DNA	ASTN1 $\Delta Cp \leq 8$	DLX1 $\Delta Cp \leq 9$	ITGA4 $\Delta Cp \leq 9$	RXFP3 $\Delta Cp \leq 9$	SOX17 $\Delta Cp \leq 9$	ZNF671 $\Delta Cp \leq 10$
10 %	20 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
1 %	20 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
0,1 %	20 ng	5 / 8*	8 / 8*	8 / 8*	6 / 8*	1 / 8*	7 / 8*
0,01 %	20 ng	0 / 9	9 / 9	3 / 9	2 / 9	0 / 9	4 / 9
0 %	20 ng	0 / 9	8 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9
10 %	100 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
1 %	100 ng	9 / 9	9 / 9	9 / 9	8 / 9	9 / 9	8 / 9
0,1 %	100 ng	8 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	1 / 9	9 / 9
0,01 %	100 ng	0 / 9	8 / 9	1 / 9	1 / 9	0 / 9	4 / 9
0 %	100 ng	0 / 9	9 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9	0 / 9

* Eine von neun Proben wurde durch ein negatives Ergebnis für ACHE invalide bewertet und ausgeschlossen.

Die Nachweisgrenze für ein positives Ergebnis der Methylierungsmarker liegt bei 1 % für eine Probe mit insgesamt 20 ng DNA bzw. 10 % für eine Probe mit 100 ng DNA pro Assay.

Die Ergebnisse eines Versuches zum Spike-In von SiHa-Zellen in Patientenmaterial zeigen, dass in Abstrichproben mit einer Konzentration von mindestens 3×10^5 Zellen pro ml ein Anteil von 0,1 % Zellen, welche eine Methylierung tragen, sicher nachgewiesen werden können.

12.1.2. Analytische Spezifität – Detektion unmethylierter DNA

Die analytische Spezifität des PCR-Assays wurde unter Verwendung von unmethylierter Bisulfit-konvertierter, das humane Genom repräsentierender 10 - 12 kb großer PCR-Fragmente ermittelt. Im Versuch erfolgte eine 5-fache Bestimmung, die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt. Die Proben wurden durch ACHE als valide eingestuft. Bis zu einer Konzentration von 750 ng unmethylierter, Bisulfit-konvertierter DNA (biDNA) wurde kein falsch-positives GynTect® Testergebnis erhalten.

Tabelle 17 Analytische Spezifität des PCR-Assays

Verwendete DNA	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0 ng unmethylierte biDNA	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
100 ng unmethylierte biDNA	0 / 5	1 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
250 ng unmethylierte biDNA	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5
500 ng unmethylierte biDNA	0 / 5	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
750 ng unmethylierte biDNA	1 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
75 ng methylierte gDNA	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5

12.2. Präzision

12.2.1. Wiederholbarkeit

20 Patientenproben wurden in drei unabhängigen Durchführungen mit GynTect® getestet, wobei jedes Mal eine neue Probenvorbereitung und Bisulfitbehandlung durchgeführt wurde. In allen drei, von einer Person an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Reaktionen wiesen 16 Proben in 3 / 3 Fällen übereinstimmende Ergebnisse auf. Somit zeigen 80 % der Proben in drei Versuchen eine 100%ige Reproduzierbarkeit.

12.2.2. Reproduzierbarkeit

20 Patientenproben wurden in drei unabhängigen Zentren (je eine Durchführung von einer unabhängigen Person) mit GynTect® getestet. Jedes Mal wurde eine neue Probenvorbereitung und Bisulfitbehandlung durchgeführt sowie verschiedene qPCR-Geräte (cobas z 480 Analyzer bzw. LightCycler® 480 II) verwendet. Der Vergleich von jeweils 2 Ergebnissen einer Probe miteinander generiert 3 Bewertungen pro Probe (Zentrum a mit Zentrum b, Zentrum b mit Zentrum c und Zentrum a mit Zentrum c). Es ergibt sich eine Übereinstimmung von 90 % bei 60 Übereinstimmungsbewertungen. Bewertet man nur die valide Übereinstimmung, so ergibt sich eine Vergleichspräzision von 96,43 %.

12.3. Robustheit

Folgende Variationen des Temperaturprofils bei der Durchführung der PCR wurden getestet und haben keine Abweichung im Endergebnis ergeben (Durchführung mit vier verschiedenen Proben sowie einer NTC):

Tabelle 18 Variationen des Temperaturprofils

Änderungen zum Originalprotokoll	Auswirkung auf Positivität GynTect® PC	Durchschnittliche Cp-Wert-Verschiebung aller Marker
65 °C Annealing Temperatur	keine	< 1
67 °C Annealing Temperatur	keine	< 1
92 °C Denaturierung Temperatur	keine	< 1
96 °C Denaturierung Temperatur	keine	< 1
96 °C Denaturierung Temperatur & 10 Sekunden Denaturierung & 30 Sekunden Annealing/Elongation	keine	Bis zu 1,12 mehr
96 °C Denaturierung Temperatur & 20 Sekunden Denaturierung & 40 Sekunden Annealing/Elongation	keine	< 1

Die Positionierung einer Patientenprobe in dem Block des PCR-Gerätes hat keinen Einfluss auf das GynTect® Ergebnis.

12.4. Klinische Leistungsbewertung

Die hier verwendeten Patientenproben wurden aus europäischen Kliniken (Deutschland, Portugal, Slowakei) bezogen.

Die Bisulfitbehandlung der Patientenproben erfolgte wie in Kapitel 11.4 beschrieben.

Für die klinische Leistungsbewertung von GynTect® wurden 321 Patientenproben mit der folgenden Prävalenzverteilung der Befunde untersucht: Pap I (n = 199; 62 %), CIN 1 (n = 20; 6,2 %), CIN 2 (n = 28; 8,7 %), CIN 3 (n = 64; 19,9 %), Zervixkarzinom (n = 10; 3,1 %).

Basierend auf dem festgelegten Cut-off wurde die klinische Sensitivität und Spezifität berechnet.

Tabelle 19 Klinische Leistungsbewertung von GynTect®

Befund nach Zytologie/Histologie	GynTect® Erkennung	KI 95 %
Pap I (n = 199)	4,02 %	1,75 % - 7,77 %
CIN 1 (n = 20)	30,00 %	11,89 % - 54,28 %
CIN 2 (n = 28)	39,29 %	21,50 % - 59,42 %
CIN 3 (n = 64)	62,50 %	49,51 % - 74,30 %
CxCa (n = 10)	100 %	69,15 % - 100 %

KI = Konfidenzintervall

Tabelle 20 Sensitivität und Spezifität

Sensitivität für CIN 3+	Spezifität für CIN 3+	Falsch-positiv Rate für Pap I
67,6 %	89,9 %	4,0 %

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

- Die Interpretation der Ergebnisse sollte stets im Zusammenhang mit Ergebnissen weiterer labordiagnostischer Verfahren sowie unter Einbeziehung des klinischen Bildes erfolgen.
- Die Vorgaben gemäß der Gebrauchsanweisung, z. B. Pipettierolumina, Inkubationszeiten, Temperaturen und Vorbereitungsschritte, sind einzuhalten, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden.
- Die korrekte Probengewinnung und -aufbewahrung sind entscheidend für die Testergebnisse.
- Grundsätzlich kann bei molekularbiologischen Testverfahren nicht ausgeschlossen werden, dass weitere sehr seltene Sequenzvarianten das Testergebnis beeinflussen könnten, die in den hinzugezogenen Quellen zur Spezifitäts- und Sensitivitätsanalyse der Primer noch nicht erfasst sind.
- Eine nicht spezifikationskonforme Geräteleistung sowie Abweichungen von der beschriebenen Testdurchführung, den spezifizierten Lagerungsbedingungen, Materialien, Geräten oder dem empfohlenen Probenmaterial können zur Folge haben, dass Differenzen zu den Ergebnissen auftreten, die bei Einhaltung aller Vorgaben erzielt werden.
- Die vorgesehenen internen und externen Kontrollen sind Hilfsmittel zur Erkennung von Störungen, sie können aber nicht jede mögliche Störung detektieren. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders vorgenommene Änderungen bzw. gegebenenfalls die verwendeten Geräte zu validieren sowie die Einhaltung der Gerätespezifikationen sicherzustellen.

14. LITERATUR

- [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. HAFTUNG

Das GynTect® Kit darf nur seiner Zweckbestimmung entsprechend verwendet werden. Für jegliche andere Verwendung (z.B. Nichteinhaltung dieser Gebrauchsanweisung und nichtbestimmungsgemäße Verwendung) und daraus resultierende Schäden übernimmt die oncgnostics GmbH keine Haftung.

16. FRAGEN UND PROBLEME

Wenn Sie Fragen zu oder Probleme mit dem Produkt haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Ansprechpartner von der oncgnostics GmbH.

Den technischen Support der oncgnostics GmbH erreichen Sie von Montag bis Freitag zwischen 8 und 16 Uhr unter folgender Telefonnummer **+49 (0) 3641 5548500**.

Außerhalb der Sprechzeiten senden Sie uns eine E-Mail an **gyntect@oncgnostics.com**.

oncgnostics GmbH

Löbstedter Straße 41

07749 Jena, Deutschland

Geschäftsführer: Dr. Alfred Hansel, Dr. Martina Schmitz

Gehen Sie vor, wie im Folgenden beschrieben, wenn während der Aufarbeitung der Zervikalproben, Durchführung der PCR und der Auswertung der Daten folgende Fehler auftreten oder wenn die GynTect® Analyse auf Grund bestimmter Kontrollen fehlschlägt.

Tabelle 21 Fehlerbehebung

Problem und Ursache	Anmerkungen und Vorschläge
ZENTRIFUGE	
Keine Zentrifuge für PCR-Streifen verfügbar	Schütteln Sie den 8-Well-Strip kräftig aus dem Handgelenk, bis sich die gesamte Flüssigkeit am Boden der Wells befindet. Die Innenseite des Deckels muss Tröpfchenfrei sein, wiederholen Sie den Vorgang gegebenenfalls.
INVALIDE SCHMELZTEMPERATUREN	
Der GynTect® Strip wurde um 180° verdreht in das PCR-Gerät gestellt	Die Schmelztemperatur der zweiten Position (B) sollte der Schmelztemperatur der Position (G) entsprechen und Well A und B zeigen für alle GynTect® Strips außer die Negativkontrolle eine Amplifikation. Die Proben sind auswertbar.
Amplifikations- und Schmelzkurven sind erkennbar, aber die Schmelztemperaturen weichen stark von den Vorgaben in der Gebrauchsanweisung ab	Kontaktieren Sie die oncgnostics GmbH für eine Lösung.

KEIN / INVALIDES PCR-ERGEBNIS

Ct-Wert von Marker IDS-M über dem Sollwert

Wiederholen Sie den Test für die Probe mit einem neuen GynTect® Assay, optional unter Verwendung eines größeren Probenvolumens (2 ml bis 3 ml) . Bei gleichbleibend negativem Ergebnis für die Marker ist die Patientenprobe nicht auswertbar.

Sollwertüberschreitung für die GynTect® Positive control und/oder GynTect® Negative control

Wiederholen Sie GynTect® für alle Proben mit aufgefüllten Proben-Eluaten (ad 80 µl GynTect® Water).

17. ZUSÄTZLICHE HINWEISE

Regulatorischer Hinweis an Kunden in der Europäischen Union: Bitte beachten Sie Ihre Meldepflicht gegenüber der für Sie zuständigen Behörde und der oncgnostics GmbH für alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorfälle.

Die aktuelle Version des Sicherheitsdatenblatts für dieses Produkt wird im Download-Center auf der Webseite (<http://www.oncgnostics.com/downloadcenter/>) bereitgestellt oder kann per E-Mail an gyntect@oncgnostics.com angefordert werden.

18. BEDEUTUNG DER SYMBOLE

Symbol	Bedeutung	Symbol	Bedeutung
	Mastermix		Lagertemperatur
	PCR-Streifen		Ungeöffnet verwendbar bis (JJJJ-MM-TT)
	Deckel		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Positivkontrolle		Hersteller
	Wasser		Gebrauchsanweisung beachten
	In-vitro-Diagnostikum		Im Dunkeln lagern
	Chargenbezeichnung		Nicht wiederverwenden
	Bestellnummer		CE-Kennzeichnung

19. **ÄNDERUNGSVERZEICHNIS**

Vorversion (Freigabedatum)	Änderung
3.5 (Mai 2022)	– Umstrukturierung, Kapitel wurden innerhalb der Gebrauchsanweisung verschoben – Kapitel 11.2 Probenentnahme ○ Lagerungsbedingungen für Zervikalproben angepasst – Kapitel 11.5.2 Durchführung der PCR am cobas z 480 Analyzer ○ Festlegung der Position von PC (Reihe 11) und NTC (Reihe 12) ○ Screenshots entfernt – Hinzufügen des Kapitels 11.5.3 GynTect® am CFX96 Real-Time PCR Detection System – Folgende Kapitel neu eingefügt: ○ Kapitel 5 Referenzmaterial ○ Kapitel 13 Grenzen des Verfahrens ○ Kapitel 14 Literatur ○ Kapitel 15 Haftung ○ Kapitel 17 Zusätzliche Hinweise ○ Kapitel 19 Änderungsverzeichnis

20. **KURZPROTOKOLL**

Im Folgenden finden Sie eine Kopiervorlage einer Kurzanleitung in Form einer Checkliste.

Lesen Sie vor Verwendung der Kurzanleitung die in Kapitel 11 ausführlich beschriebene Gebrauchsanweisung mit allen Hinweisen gründlich durch.

Das Bisulfit-Kit ist nicht Teil des GynTect® Kits. Die Bisulfitbehandlung der Proben muss mit dem EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) durchgeführt werden.

PROBENVORBEREITUNG

- ☐ Vortexen der Patientenproben für 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und Überführen von 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- ☐ Proben 5 Minuten bei 10.000 xg zentrifugieren
- ☐ 900 µl Überstand über dem Pellet abnehmen und verwerfen

BISULFITBEHANDLUNG DER PROBEN

- ☐ EpiTect® Fast Bisulfite Kit-Puffer gemäß Tabelle a vorbereiten

Tabelle a Vorbereitung der Puffer des EpiTect® Fast Bisulfite Kits (Qiagen)

Puffer	Zugabe Ethanol
Buffer BL *	-
Buffer BW	30 ml Ethanol (96 - 100 %)
Buffer BD	27 ml Ethanol (96 - 100 %)

* keine Carrier RNA hinzufügen, Kontrolle der Beschaffenheit der Lösung

- ☐ Ansatz in 0,5 ml Reaktionsgefäß gemäß Tabelle b herstellen, vortexen und abzentrifugieren

Tabelle b Ansatz für die Bisulfit-Reaktion

Komponente	pro Reaktion
Bisulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Resuspendierte Probe	40 µl
Gesamtvolumen pro Reaktion	140 µl

* Kontrolle der Beschaffenheit der Lösung

- ☐ Konvertierung in einem Thermocycler gemäß Tabelle 7 durchführen
- ☐ Proben vortexen und abzentrifugieren
- ☐ **310 µl Buffer BL** auf die MinElute® Spin Column pipettieren
- ☐ Probe hinzufügen und 5 x auf und ab pipettieren
- ☐ **250 µl Ethanol** (96 - 100 %) pipettieren und 5 x über Kopf schwenken
- ☐ Säule 30 Sekunden bei 18.000 xg zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- ☐ **200 µl Buffer BW** pipettieren und 30 Sekunden bei 18.000 xg zentrifugieren
- ☐ **200 µl Buffer BD** pipettieren und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- ☐ Säule 30 Sekunden bei 18.000 xg zentrifugieren
- ☐ **200 µl Buffer BW** pipettieren, 30 Sekunden bei 18.000 xg zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- ☐ **400 µl Buffer BW** pipettieren und 30 Sekunden bei 18.000 xg zentrifugieren
- ☐ **200 µl Ethanol** (96 - 100 %) pipettieren und 30 Sekunden bei 18.000 xg zentrifugieren

- ☐ Säule in 2 ml Collection-Tube umsetzen und 60 Sekunden bei 18.000 ×g zentrifugieren
- ☐ Säule in 1,5 ml Reaktionsgefäß umsetzen, **20 µl Wasser** auf Säule pipettieren und 60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubieren
- ☐ Säule und Reaktionsgefäß 60 Sekunden bei 8.000 ×g zentrifugieren
- ☐ *Optionaler Haltepunkt:* Die Aufarbeitung der Proben kann hier unterbrochen werden

VORBEREITUNG UND PIPETTIEREN DER PCR

- ☐ Probe mit **70 µl GynTect® Water** auffüllen, vortexen und abzentrifugieren
- ☐ **GynTect® Mastermix** vortexen und abzentrifugieren
- ☐ Farbigen Deckel der **GynTect® Strips** abziehen und verwerfen
- ☐ Pro Well **10 µl GynTect® Mastermix** pipettieren
- ☐ **10 µl Probe** bzw. **GynTect® Positive Control** bzw. **GynTect® Water** in jedes der acht Wells eines **GynTect® Strips** pipettieren
- ☐ **GynTect® Strips** mit **GynTect® Caps** verschließen
- ☐ **GynTect® Strips** vortexen und zentrifugieren

DURCHFÜHRUNG DER PCR

- ☐ PCR-Gerät einschalten, Software öffnen und Template (GynTect) wählen
- ☐ PCR-Lauf individuell benennen, Plattenlayout bearbeiten, Temperaturprofil überprüfen
- ☐ PCR-Lauf abspeichern
- ☐ **GynTect® Strips** in das Gerät stellen und PCR-Lauf starten
- ☐ Nach Beendigung der PCR die Auswerte-Einstellungen tätigen und die .txt- oder .xlsx-Datei exportieren

AUSWERTUNG UND INTERPRETATION DER PCR-DATEN

- ☐ Öffnen der exportierten Datei (.txt bzw. .xlsx) mit einem geeigneten Tabellenkalkulationsprogramm
- ☐ Überprüfen der Validität der **Positivkontrolle** und **Negativkontrolle** für alle Marker
- ☐ Überprüfung der Validität und Positivität der Ergebnisse für die durchgeführten Proben

Tabelle c Validitäts- und Positivitätskriterien

Marker	Ct-Wert	Schmelztemperatur-Intervall (cobas)	Schmelztemperatur-Intervall (CFX)	ΔC_t (Marker x – IDS-M)	Kriterium für
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 86 °C	78 °C – 86 °C	$\leq 8,00$	Positivität
DLX1	$\geq 20, \leq 42$	79 °C - 85 °C	77 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
ITGA4	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
RXFP3	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C – 85 °C	$\leq 9,00$	
SOX17	$\geq 20, \leq 42$	81 °C - 87 °C	79 °C – 87 °C	$\leq 9,00$	
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 87 °C	78 °C – 87 °C	$\leq 10,00$	
ACHE	$\geq 20, \leq 42$	78 °C - 83 °C	76 °C – 83 °C	-	Validität
IDS-M	$\geq 20, \leq 32$	78 °C - 88 °C	76 °C – 88 °C		

- ☐ Bewertung des **GynTect® Ergebnisses**

Tabelle c Wertung der GynTect® Marker

Marker	Markerwert bei positivem Einzelmarkerergebnis	Markerwert bei negativem Einzelmarkerergebnis
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Summe aller
Markerwerte ≥ 6
→ **GynTect® positiv**

Ein positives GynTect® Testergebnis korreliert mit dem Vorhandensein einer zervikalen, intraepithelialen Neoplasie oder eines Zervixkarzinoms. GynTect® ist nicht als letzte Therapieentscheidung einzusetzen und in Verbindung mit anderen ärztlichen Befunden auszuwerten.