



ScreenYu Gyn®

Basis UDI-DI: 426076785SCREENYUGYNP6

Gebrauchsanweisung



SG001-46



Bis zu 46 Proben

UDI-DI

4260767852212

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

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

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



Revision 7
2025-08



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

LAGERUNG UNMITTELBAR NACH ANLIEFERUNG

Das ScreenYu Gyn® Kit wird bei Raumtemperatur versendet und die Überschreitung des validierten Temperaturintervalls mittels Temperaturmesspunkt überwacht. Überprüfen Sie direkt nach Anlieferung den am Kit angebrachten Temperaturmesspunkt auf Farbumschlag 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 ScreenYu Gyn® Kit und seine Komponenten bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.



Überwachung der Transporttemperatur

Der am ScreenYu Gyn® 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 ScreenYu Gyn® Kits nicht mehr gewährleistet werden können. Wenden Sie sich in diesem Fall an Epitype GmbH.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zweckbestimmung.....	4
2	Klinische Bedeutung.....	4
3	Testprinzip	4
4	Design des ScreenYu Gyn® Assays	5
4.1	ScreenYu Gyn® Strips.....	5
4.2	Kontrollen	5
4.2.1	Qualitätskontrolle Bisulfitbehandlung (Kontrollmarker ACTB).....	5
4.2.2	Positivkontrolle	6
4.2.3	Negativkontrolle	6
5	Referenzmaterial.....	6
6	Inhalt des Kits	6
7	Verbrauchsmaterialien und Equipment (nicht im Kit enthalten)	7
8	Lagerung und Haltbarkeit.....	8
9	Sicherheitshinweise.....	8
9.1	Allgemeine Hinweise	8
9.2	Raumaufteilung.....	9
9.3	Vermeidung von Kontaminationen.....	9
9.4	Anleitung zur Handhabung.....	10
10	Entsorgung.....	10
11	ScreenYu Gyn® Verfahren.....	11

11.1	Arbeitsablauf.....	11
11.2	Probenentnahme	11
11.3	Probenvorbereitung	12
11.4	Bisulfitbehandlung der Proben	12
11.5	PCR	13
11.5.1	Vorbereitung und Pipettieren der PCR	13
11.5.2	Durchführung der PCR am cobas z 480 Analyzer	14
11.5.3	Durchführung der PCR am CFX96 Real-Time PCR Detection System	19
12	Leistungsmerkmale von ScreenYu Gyn®	23
12.1	Analytische Leistungsmerkmale.....	23
12.1.1	Analytische Sensitivität	23
12.1.2	Analytische Spezifität – Detektion unmethylierter DNA.....	24
12.2	Präzision.....	25
12.2.1	Wiederholbarkeit.....	25
12.2.2	Reproduzierbarkeit.....	25
12.3	Richtigkeit	25
12.4	Genauigkeit.....	25
12.5	Robustheit.....	25
12.6	Cut-off.....	25
12.7	Klinische Leistungsbewertung.....	26
13	Grenzen des Verfahrens	27
14	Literatur	27
15	Haftung	27
16	Fragen und Probleme	28
17	Zusätzliche Hinweise	28
18	Bedeutung der Symbole	28
19	Änderungsverzeichnis	29
20	Kurzprotokoll	29

1 ZWECKBESTIMMUNG

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

ScreenYu Gyn® ist nur zur Verwendung durch qualifiziertes Personal im Labor bestimmt, das mit molekularbiologischen Techniken vertraut ist. Die Interpretation der Ergebnisse sollte stets im Zusammenhang mit Ergebnissen weiterer labordiagnostischer Verfahren sowie unter Einbeziehung des klinischen Bildes erfolgen.

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 und/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 ScreenYu Gyn®, die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer zu behandelnden Krebserkrankung oder dessen Vorstufe mit großer Genauigkeit zu bestimmen.

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

3 TESTPRINZIP

ScreenYu Gyn® basiert auf dem Nachweis eines epigenetischen Biomarkers, d.h. die Methylierung eines spezifischen DNA-Abschnittes, dessen Vorkommen mit der Existenz von präkanzerösen Läsionen oder einem Zervixkarzinom korreliert [4, 5, 6]. Zudem wird ein bisulfitspezifischer Referenzmarker analysiert. Die verwendeten Markerregionen sind in nachstehender Tabelle dargestellt.

Übersicht der Markerregionen

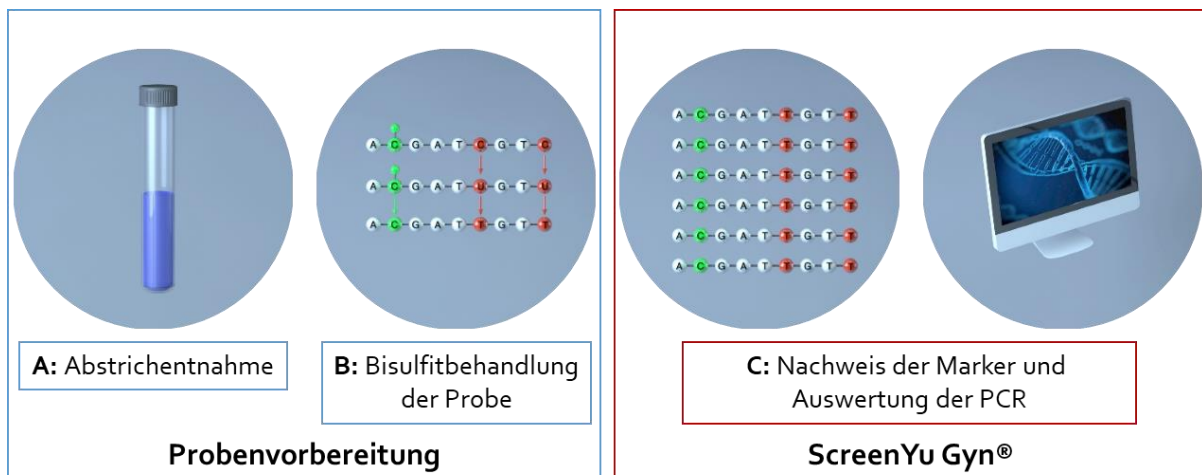
Bezeichnung im Protokoll	Markerregion (Gen Bezeichnung)	Fluoreszenzfarbstoff
Methylierungsmarker	ZNF671	ROX
Kontrollmarker	ACTB	FAM

Der Nachweis wird mithilfe der hochsensitiven Sonden-basierten 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 ScreenYu Gyn® umfasst zwei Schritte.

Zuerst wird die DNA aus dem Zervixabstrich in einer Bisulfitreaktion konvertiert und die Methylierung fixiert. Im zweiten Schritt wird die eluierte Bisulfit-behandelte DNA in einer methylierungsspezifischen, Sonden-basierten Real-Time PCR analysiert. Der ursprünglich methylierte DNA-Abschnitt wird mit Hilfe der in den ScreenYu Gyn® Strips vorliegenden Primer selektiv amplifiziert. Die Detektion des Methylierungs- und Kontrollmarkers wird unter Verwendung von Sonden durchgeführt, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. 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 ScreenYu Gyn® Kits. Speziell vorgesehene Produkte für die Probenentnahme und die Bisulfitbehandlung sind separat erhältlich.



Testprinzip

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

B: Das Diagnostiklabor führt eine Bisulfitbehandlung der Patientenprobe durch.

C: Pro Probe wird eine Duplex-PCR-Reaktion durchgeführt. Die Auswertung erfolgt über die Detektion der im ScreenYu Gyn® Strip enthaltenen Farbstoff-markierten Sonden.

4 DESIGN DES SCREENYU GYN® ASSAYS

4.1 ScreenYu Gyn® Strips

ScreenYu Gyn® ist ein auf TaqMan Sonden basierender Assay. Ein ScreenYu Gyn® Strip ist ein 8-Well PCR-Streifen, der in jedem Well zwei Primerpaare plus dazugehöriger Sonde zur Amplifikation des methylierungsspezifischen Markers ZNF671 und des Kontrollmarkers ACTB enthält. Für die Analyse einer Patientenprobe wird ein Well eines ScreenYu Gyn® Strips benötigt.

4.2 Kontrollen

Das Design des ScreenYu Gyn® Kits umfasst drei Kontrollen, welche einerseits die Probenqualität und Bisulfitbehandlung (Marker ACTB) überwachen als auch die Qualität der PCR-Reaktion (Positivkontrolle und Negativkontrolle) kontrollieren.

4.2.1 Qualitätskontrolle Bisulfitbehandlung (Kontrollmarker ACTB)

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 Beta-Actin (ACTB). Wenn keine ACTB-Amplifikation mit einem Ct-Wert unter 32 stattfindet, wird der Assay der Probe invalide gewertet und muss wiederholt werden.

4.2.2 Positivkontrolle

Die Positivkontrolle überwacht die Qualität der PCR-Reaktion. Bei der Amplifikation der ScreenYu Gyn® Positive Control (PC) muss sowohl für den Methylierungsmarker als auch für den Kontrollmarker ein Ct-Wert unterhalb von 38 erzeugt werden. Andernfalls ist die PCR-Reaktion invalide und muss wiederholt werden.

4.2.3 Negativkontrolle

Bei der Durchführung der Negativkontrolle handelt es sich um eine Kontrollreaktion mit ScreenYu Gyn® Water (Wasser, NTC – No Template Control) als Template, die in beiden Markern negativ sein muss. Treten Ct-Werte in der Negativkontrolle auf, ist eine Kontamination sehr wahrscheinlich und der ScreenYu Gyn® Assay muss wiederholt werden.

5 REFERENZMATERIAL

Es ist kein internationales Referenzmaterial verfügbar.

6 INHALT DES KITS

Inhalt des ScreenYu Gyn® Kits

Bezeichnung der Komponenten	Symbol	Inhalt	Volumen / Menge SGo01-46
ScreenYu Gyn® Mastermix		PCR-Mastermix ¹ (2-fach)	1 x 0,55 ml
ScreenYu Gyn® Strips		PCR-Streifen ²	6 Stück
ScreenYu Gyn® Caps		Deckelstreifen für Strip	6 Stück
ScreenYu Gyn® Positive Control		Positivkontrolle	1 x 90 µl
ScreenYu Gyn® Water		Wasser	1 x 2 ml
Instructions for use	-	Gebrauchsanweisung	1

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

² Enthält die für die PCR benötigten Primer und Sonden.

7 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND EQUIPMENT (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

ScreenYu Gyn® 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.

Benötigtes Equipment

Equipment	Katalog Nr.	Order
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD)	D5030-E, D5031-E	Zymo Research Europe GmbH
PCR-Reaktionsgefäß PP, 0,1 ml ohne Deckel, low profile, 8er-Streifen, weiß, np pcr ready *	04-032-0556	Nerbe plus GmbH & Co. KG
Deckel für PCR-Reaktionsgefäß PP, 0,1 ml & 0,2 ml, flach, 8er-Streifen, hoch transparent, np pcr ready *	04-043-0500	Nerbe plus GmbH & Co. KG
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	-	Hologic, Inc.
Cervex-Brush® bzw. Cervex-Brush® Combi	-	Rovers Medical Devices

* Zu verwenden als Balance Strips in der PCR, siehe Plattenbelegung auf Seite 15 bzw. Seite 19.

Die folgende Laborausstattung sowie Verbrauchsmaterialien werden benötigt, um den ScreenYu Gyn® 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 Mixer / 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/2 ml Reaktionsgefäße
- 96-Well Rack für PCR-Streifen
- Ethanol 96-100 %, unvergällt
- Real-time PCR-Gerät, Detektionskanäle für die Sondenfarbstoffe FAM und ROX

ScreenYu Gyn® wurde mit folgenden Real-time PCR-Geräten validiert:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) mit 96-Well-Block, Adapter für PCR-Streifen und LightCycler® 480 Software 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

8 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

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

Lagerungstemperatur des ScreenYu Gyn® Kits sowie des nicht im Kit enthaltenen Equipments

Equipment	Lagerungstemperatur
ScreenYu Gyn® Kit	2 °C bis 8 °C
EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD)	15 °C bis 30 °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 sollte 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 ScreenYu Gyn® nicht, wenn die Verpackung der Reagenzien beschädigt ist. Setzen Sie sich mit Ihrem Händler in Verbindung.
- Verwenden Sie das ScreenYu Gyn® 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.

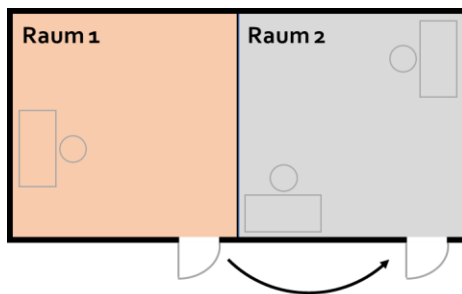
- Das Pipettieren von kleinen Flüssigkeitsmengen im Mikroliterbereich erfordert Übung. Achten Sie daher darauf, dass Sie die benötigten Volumina mit den Mikropipetten so präzise wie möglich pipettieren.
- Die geltenden regulatorischen Anforderungen an den Betreiber sind einzuhalten.
- Das Befolgen der 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 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.



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 über 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.
- Die ScreenYu Gyn® Strips und ScreenYu Gyn® Caps sind während der gesamten Durchführung nicht ohne Einmalhandschuhe zu berühren, da sonst unspezifische Fluoreszenzsignale auftreten können.
- Die ScreenYu Gyn® Strips und ScreenYu Gyn® Caps sind für den Einmalgebrauch bestimmt und können nicht wiederverwendet werden.
- Bewahren Sie die unbenutzten ScreenYu Gyn® Strips und ScreenYu Gyn® Caps in der Originalverpackung auf. Es ist zwingend erforderlich die ScreenYu Gyn® Strips vor Licht zu schützen.

10 ENTSORGUNG

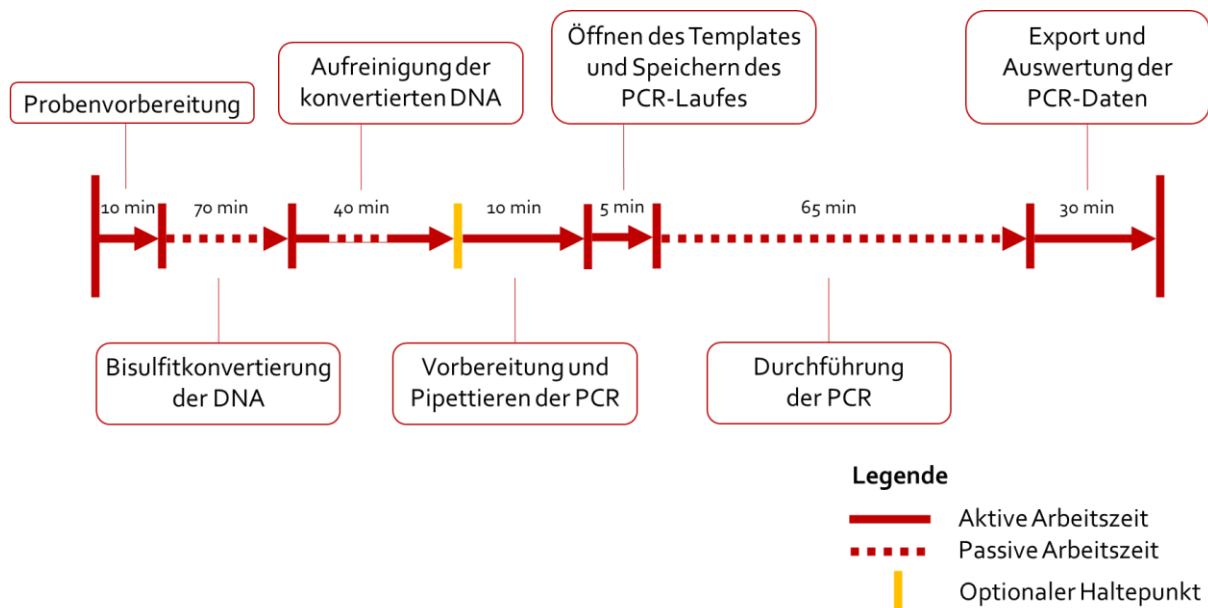
Das unbenutzte ScreenYu Gyn® Kit und dessen Komponenten können ohne weitere besondere Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Patientenproben und benutzte Reaktionsgefäße sind wie infektiöser Abfall zu handhaben. Alle Reagenzien sind den gesetzlichen Vorschriften entsprechend zu entsorgen.

11 SCREENYU GYN® VERFAHREN

Das folgende Kapitel enthält eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Arbeitsschritte von der Probenentnahme bis hin zur Auswertung der Daten.

11.1 Arbeitsablauf

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



Zeitstrahl des ScreenYu Gyn® Arbeitsablaufes

11.2 Probenentnahme

Das Probenentnahmeset ist nicht Teil des ScreenYu Gyn® Kits. ThinPrep® PreservCyt® Probenröhrchen (Hologic, Inc.) und Cervex-Brush® Probenentnahmegeräte (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 Probenentnahmegerätes sollte nach der Entnahme nicht im Probengefäß verbleiben, da sonst die Performance von ScreenYu Gyn® beeinträchtigt wird.

Als Abstrichmedium muss ThinPrep® PreservCyt® Solution verwendet werden. Die Verwendung anderer Probenmedien war nicht Teil der Validierung des ScreenYu Gyn® 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 der Abstrichentnahmebürste im Probengefäß, so wird dieser zunächst entfernt und verworfen.

- 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!

- Zentrifugieren Sie die Proben **5 Minuten** bei **10.000 xg**.
- 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.

- Resuspendieren Sie das Pellet durch Vortexen für 3 Sekunden. 20 µl der resuspendierten Probe werden in die Bisulfitbehandlung eingesetzt. Die restlichen 80 µl werden verworfen.

11.4 Bisulfitbehandlung der Proben

Das Bisulfit-Kit ist nicht Teil des ScreenYu Gyn® Kits. ScreenYu Gyn® wurde mit dem EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) validiert.

- **Input:** Geben Sie **20 µl** der **resuspendierten Probe** + **130 µl Lightning Conversion Reagent** in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß.
- Führen Sie die Bisulfitbehandlung, bis auf nachfolgende Änderungen, entsprechend den Herstellerangaben des EZ DNA Methylation-Lightning Kits durch:

- Verwerfen Sie nach dem letzten Waschschrift den Durchfluss.
- Zentrifugieren Sie die Säule in dem leeren Collection Tube für **1 Minute** bei **full speed** trocken.

Achtung: Durch Überspringen bzw. Weglassen dieses Schrittes wird die Performance des ScreenYu Gyn® Assays, auf Grund von Ethanol-Resten im Eluat, beeinflusst.

- Eluieren Sie in **15 µl M-Elution Buffer** für **30 Sekunden** bei **8.000 xg**.

11.5 PCR

Vor dem Ansetzen der PCR sollte sichergestellt sein, dass das PCR-Temperaturprotokoll an dem für ScreenYu Gyn® zugelassenen Real-time PCR-Gerät einprogrammiert ist. Dazu verfahren Sie für das Programmieren des PCR-Templates am cobas z 480 Analyzer wie auf Seite 14 beschrieben. Die Erläuterung für die PCR am CFX96 Real-Time PCR Detection System finden Sie ab Seite 19.

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) durchgeführt.

Beachten Sie die vorgegebene Plattenbelegung, wie auf Seite 15 bzw. Seite 19 beschrieben. Die Positivkontrolle (PC) ist in Well A1 und die Negativkontrolle (NTC) in Well B1 zu pipettieren.

- Entnehmen Sie dem Kit den **ScreenYu Gyn® Mastermix** sowie die benötigte Anzahl an **ScreenYu Gyn® Strips** und setzen Sie diese auf ein 96-Well Rack.

Achtung: Ein **ScreenYu Gyn® Strip** reicht für acht PCR-Assays. Es ist zu beachten, dass für jeden PCR-Lauf eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (Wasser, NTC) mitzuführen sind.

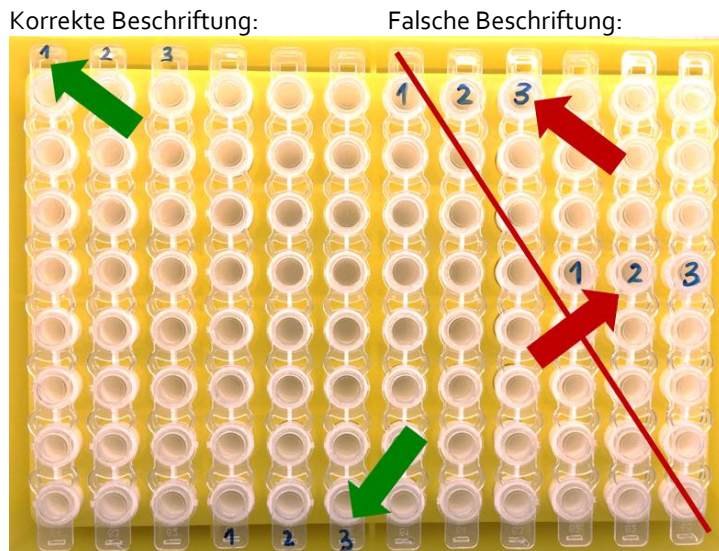
- Vortexen Sie den **ScreenYu Gyn® Mastermix** 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie diesen ab.
- Ziehen Sie die **PCR-Deckel-Streifen** von den ScreenYu Gyn® Strips ab und **verwerfen** Sie diese.
- Geben Sie in jedes Well des ScreenYu Gyn® Strips **10 µl** des **ScreenYu Gyn® Mastermix** hinzu.
- Vortexen Sie die Proben-Eluate 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie diese kurz ab.
- Geben Sie in das mit **ScreenYu Gyn® Mastermix** belegte Well **10 µl Probe** hinzu.

Wichtig: Wechseln Sie die Pipettenspitze für jeden Pipettierschritt.

Hinweis: Bewahren Sie den Rest der Proben-Eluate für eine ggf. benötigte Wiederholung der ScreenYu Gyn® PCR auf.

- Vortexen Sie die **ScreenYu Gyn® Positive Control** 3 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie diese ab.
- Fügen Sie in das Well A1 **10 µl ScreenYu Gyn® Positive Control** und in Well B1 **10 µl ScreenYu Gyn® Water** als Negativkontrolle hinzu.
- Verschließen Sie jeden **ScreenYu Gyn® Strip** mit einem unbenutzten **ScreenYu Gyn® Cap** (transparenter Druckverschlussbeutel).

Achtung: Berühren Sie nicht die Innenseiten der **ScreenYu Gyn® Strips** und **ScreenYu Gyn® Caps**. Achten Sie darauf, dass der **ScreenYu Gyn® Cap** nach Verschließen richtig auf dem **ScreenYu Gyn® Strip** sitzt. Die Überprüfung erfolgt am besten durch seitliche Sichtkontrolle.



Achtung:

Beschriften Sie die Caps nicht auf den Wells, da das Auslesen des PCR-Signals von oben durch die Deckel erfolgt und bei dortiger Beschriftung zu falschen Fluoreszenzsignalen führt.

Zur Beschriftung der Caps eignet sich die am unteren bzw. oberen Ende befindliche große Lasche.

- Vortexen Sie alle verschlossenen **ScreenYu Gyn® 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 ScreenYu Gyn® an den Real-Time PCR-Systemen cobas z 480 Analyzer (blau markiert) bzw. CFX96 Real-Time PCR Detection System (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 Erstellen 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.

- 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 freiprogrammierbaren Geräte-Modus zu wechseln.
- Wählen Sie rechts in der Aktionsleiste „Tools“  und erstellen Sie ein neues *Detection Format*. Nennen Sie es ScreenYu Gyn. Wählen Sie die Filterkombination 465-510 und 540-610 (Excitation-Emission). Schließen Sie das Fenster über den *Close* Button.
- Wählen Sie *New Experiment*, um ein neues Template zu erstellen. Stellen Sie im Reiter *Run Protocol* das *Detection Format* auf *ScreenYu Gyn* und setzen Sie das *Reaction Volume* auf 20 µl. Programmieren Sie das Temperaturprotokoll gemäß nachstehender Tabelle.

PCR-Temperaturprotokoll 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
			61 °C	Single	00:00:30	2.2
Cooling	1 x	None	37 °C	None	00:01:00	2.2

- Speichern Sie das Run-Template unter dem Namen ScreenYu Gyn ab. Dazu wählen Sie unter *Apply Template* → *Save as Template* und legen das Template am gewünschten Ort 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, indem Sie unter *New Experiment from Template* → *ScreenYu Gyn* wählen. Überprüfen Sie, dass das korrekte Temperaturprotokoll eingestellt ist.

- Erstellen Sie im *Subset Editor* je nach Plattenlayout ein *Subset-Template*. Dazu betätigen Sie den Button „+“, wählen alle belegten Wells im Layout an und bestätigen das Template mittels des Buttons *Apply*. Dieses *Subset-Template* kann über *Apply Template* → *Save as Template* am gewünschten Ort abgelegt werden.
- Wählen Sie ein geeignetes Plattenlayout:

	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											

Beispiel Plattenbelegung für 6 Patientenproben (1 - 6)

Auswertung einer unvollständig belegten Platte erfolgt mittels festgelegtem Subset im Subset Editor.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	7	15	23	31	39	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip
B	NTC	8	16	24	32	40						
C	1	9	17	25	33	41						
D	2	10	18	26	34	42						
E	3	11	19	27	35	43						
F	4	12	20	28	36	44						
G	5	13	21	29	37	45	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip
H	6	14	22	30	38	46						

Beispiel Plattenbelegung für 46 Patientenproben (1 - 46)

Auswertung einer unvollständig belegten Platte erfolgt mittels festgelegtem Subset im Subset Editor.

Wichtig: Die Plattenbelegung ist nicht variabel. Die Positivkontrolle (PC) ist in Well A1 und die Negativkontrolle (NTC) in Well B1 zu positionieren. Leere Positionen sind mit leeren Streifen (Balance Strip) zum Austarieren zu besetzen, siehe Kapitel 7.

- Definieren Sie im *Sample Editor* die Probenbeschriftung. Wählen Sie dazu unter *Step 2: Select Samples* → *Subset* ein definiertes Subset-Template aus und tragen Sie die Probenbezeichnung *Sample Name* unter *Step 3: Edit Properties* ein. Dieses Sample-Template kann über *Apply Template* → *Save as Template* am gewünschten Ort gespeichert werden.
- Stellen Sie die Strips senkrecht in definierter Reihenfolge in das PCR-Gerät.
Wichtig: Verwenden Sie den Adapter für PCR-Streifen (erhältlich bei der Roche Diagnostics GmbH).
- Speichern Sie den PCR-Lauf durch Betätigen des „Disketten“-Buttons (rechts in der Aktionsleiste) im gewünschten Ordner 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 Auswertung der PCR-Daten* 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 Auswertung der PCR-Daten

Im Folgenden wird die Auswertung der exportierten Daten beschrieben. Diese Anleitung ist unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel erstellt worden. Die Verwendung anderer geeigneter Programme ist ebenfalls möglich.

- 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 Auswertung am Rechner des cobas z 480 Analyzers durch.
- Wählen Sie unter *Analysis* den Auswerte-Algorithmus *Abs Quant/Fit Points* und gegebenenfalls das festgelegte Subset.
- 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.
- Überprüfen Sie im Reiter *Noise Band*, dass der *STD Multiplier* auf 12 eingestellt ist und die *Noise Band* automatisch berechnet wird.
- Aufgrund der Detektion von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, erfolgt die Analyse der PCR-Daten für jeden Marker separat. Der jeweilige Detektionskanal wird über den Button *Filter Comb* ausgewählt:

Filterkombinationen und Thresholdeinstellungen am cobas z 480 Analyzer

Marker	Detektionskanal	Sonde	Threshold
ACTB	465-510	FAM	1,2
ZNF671	540-610	ROX	0,5

- Überprüfen Sie im Reiter *Analysis*, dass die Anzahl der *Fit Points* auf 2 eingestellt ist.
- Stellen Sie den *Threshold* für **ACTB** auf **1,2** und betätigen Sie den Button *Calculate*, um die Analyse durchzuführen. Exportieren Sie die Datentabelle unter *Samples* über *Export Table* mittels Rechtsklick als .txt-Datei und speichern Sie diese an einem geeigneten Ort unter einem eindeutigen Namen ab.

- Anschließend stellen Sie den *Threshold* für **ZNF671** auf **0,5** und betätigen Sie den Button *Calculate*, um die Analyse durchzuführen. Exportieren Sie die Datentabelle unter *Samples* über *Export Table* mittels Rechtsklick als .txt-Datei und speichern Sie diese an einem geeigneten Ort unter einem eindeutigen Namen ab.

Achtung: Werten Sie die beiden Marker wie beschrieben immer nacheinander aus, da die manuell eingestellten Thresholdwerte vom Programm immer auf alle Filter angewendet werden.

- Öffnen Sie ein Tabellenkalkulationsprogramm, wie Microsoft Excel, und kopieren Sie alle Daten beider .txt-Dateien, sowohl für den Marker ZNF671 (Selected Filter: 540-610) als auch für den Marker ACTB (Selected Filter: 465-510), hinein.
- Formatieren Sie die Daten so, dass die Ergebnisse der verschiedenen Proben untereinander und die Marker ZNF671 und ACTB nebeneinander dargestellt werden.

Pos	Name	Cp ZNF671	Cp ACTB	$\Delta\text{Cp}_{\text{ZNF671-ACTB}}$
A1	PC	31.98	32.12	
B1	NTC			
C1	Sample 1		36.22	
D1	Sample 2	36.39	30.22	6.17
E1	Sample 3		31.50	
F1	Sample 4		31.27	
G1	Sample 5	31.61	30.32	1.29
H1	Sample 6		31.21	

Überprüfung der Validität des PCR-Laufes

Der PCR-Lauf ist valide, wenn Positiv- und Negativkontrolle folgende Kriterien einhalten:

Validitätskriterien der ScreenYu Gyn® Kontrollen

Marker	Cp-Wert für Positivkontrolle	Cp-Wert für Negativkontrolle
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	kein Wert
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	kein Wert

Überprüfung der Validität der Proben

Das Ergebnis der Patientenprobe ist valide, wenn für den Kontrollmarker ACTB folgendes Kriterium erfüllt ist:

Validitätskriterien der Patientenprobe

Marker	Cp-Wert für Patientenprobe
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Bewertung des ScreenYu Gyn® Assays

Wird für den Methylierungsmarker ZNF671

- kein Cp-Wert generiert, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **negativ** gewertet.
- ein Cp-Wert $> 0; < 20$ generiert, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **invalide** gewertet.

- wird ein Cp-Wert ≥ 20 ; ≤ 42 generiert, erfolgt die Berechnung des ΔCp nach folgender Gleichung:

Berechnung ΔCp

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

Beträgt der $\Delta\text{Cp} \leq 9,00$, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **positiv** gewertet.

Beträgt der $\Delta\text{Cp} > 9,00$, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **negativ** gewertet.

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

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

11.5.3.1 Erstellen eines PCR-Templates

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

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

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

* Bei Step 3 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.

- Setzen Sie das Reaktionsvolumen auf 20 µl und stellen Sie die Temperatur der Deckelheizung Lid auf 105 °C.
- Speichern Sie das PCR-Template unter dem Namen ScreenYu Gyn 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.

- Platzieren Sie die **ScreenYu Gyn® Strips** im PCR-Gerät, indem Sie diese vertikal in die kleinen Vertiefungen des Heizblockes einsetzen. Wählen Sie ein geeignetes Plattenlayout.

	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											

Beispiel Plattenbelegung für 6 Patientenproben (1 - 6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	7	15	23	31	39	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip	Balance Strip
B	NTC	8	16	24	32	40						
C	1	9	17	25	33	41						
D	2	10	18	26	34	42						
E	3	11	19	27	35	43						
F	4	12	20	28	36	44						
G	5	13	21	29	37	45						
H	6	14	22	30	38	46						

Beispiel Plattenbelegung für 46 Patientenproben (1 - 46)

Wichtig: Die Plattenbelegung ist **nicht** variabel. Die Positivkontrolle (PC) ist in Well A1 und die Negativkontrolle (NTC) in Well B1 zu positionieren.

Leere Positionen sind mit leeren Streifen (Balance Strip) zum Austarieren zu besetzen, siehe Kapitel 7.

- Benennen Sie den Lauf unter einem geeigneten Dateinamen. Beachten Sie, dass alle Kanäle *All Channels* detektiert werden, 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 Auswertung der PCR-Daten

Im Folgenden wird die Auswertung der exportierten Daten beschrieben.

- Öffnen Sie an einem Computer die BioRad 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. Über den Button *Select Fluorophores* werden die verwendeten Farbstoffe FAM und ROX ausgewählt. Die dazugehörigen Marker ACTB (FAM) und ZNF671 (ROX) können unter *Target Names* definiert werden. 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.
- Unter *Settings* werden die Auswerteeinstellungen eingestellt. Die Parameter unter *Baseline Threshold* müssen für jedes Fluorophor separat definiert werden. Dafür müssen die Marker im Reiter *Quantification* ab- oder angewählt werden.

Auswerteeinstellungen am CFX96 Real-Time 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

- Wählen Sie alle Proben an und exportieren Sie die Daten für beide Marker gleichzeitig, indem Sie die Datentabelle mittels Rechtsklick über *Export to Excel* als .xlsx-Datei an einem geeigneten Ort unter einem eindeutigen Namen abspeichern.
- Formatieren Sie die Daten so, dass die Ergebnisse der verschiedenen Proben untereinander und die Marker ZNF671 und ACTB nebeneinander dargestellt werden.

Pos	Name	Cq _{ZNF671}	Cq _{ACTB}	$\Delta Cq_{ZNF671-ACTB}$
A1	PC	30.32	30.33	
B1	NTC			
C1	Sample 1		34.16	
D1	Sample 2	35.74	29.23	6.50
E1	Sample 3		29.60	
F1	Sample 4		29.47	
G1	Sample 5	30.61	28.48	2.13
H1	Sample 6		28.72	

Überprüfung der Validität des PCR-Laufes

Der PCR-Lauf ist valide, wenn Positiv- und Negativkontrolle folgende Kriterien einhalten:

Validitätskriterien der ScreenYu Gyn® Kontrollen

Marker	Cq-Wert für Positivkontrolle	Cq-Wert für Negativkontrolle
ZNF671	$\geq 20; \leq 38$	kein Wert
ACTB	$\geq 20; \leq 38$	kein Wert

Überprüfung der Validität der Proben

Das Ergebnis der Patientenprobe ist valide, wenn für den Kontrollmarker ACTB folgendes Kriterium erfüllt ist:

Validitätskriterien der Patientenprobe

Marker	Cq-Wert für Patientenprobe
ACTB	$\geq 20; \leq 32$

Bewertung des ScreenYu Gyn® Assays

Wird für den Methylierungsmarker ZNF671

- kein Cq-Wert generiert, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **negativ** gewertet.
- ein Cq-Wert > 0 ; < 20 generiert, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **invalide** gewertet.
- wird ein Cq-Wert ≥ 20 ; ≤ 42 generiert, erfolgt die Berechnung des ΔCq nach folgender Gleichung:

Berechnung ΔCq

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

Beträgt der $\Delta Cq \leq 10,00$, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **positiv** gewertet.

Beträgt der $\Delta Cq > 10,00$, wird das **ScreenYu Gyn® Ergebnis** für diese Probe **negativ** gewertet.

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

12 LEISTUNGSMERKMALE VON SCREENYU GYN®

Gezeigt werden die Leistungsdaten des CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Systems. Bei Abweichungen der Daten zum cobas z 480 Analyzer werden diese separat aufgeführt. Werden die Daten vom cobas z 480 Analyzer nicht explizit gezeigt, entsprechen diese den dargestellten Daten für das CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

12.1 Analytische Leistungsmerkmale

12.1.1 Analytische Sensitivität

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 aufgeführt. Die Verdünnungsreihen wurden in 9-fach Bestimmung getestet. Bei einem Abstrich werden im Durchschnitt 120 - 180 ng DNA in den Assay eingesetzt.

Analytische Sensitivität – Teil 1

Eingesetzte DNA	Ungefähre Anzahl Zellen im Assay*	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
0,2 ng	30 Zellen	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 Zellen	9 / 9	9 / 9
0,05 ng	7,5 Zellen	9 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 Zellen	9 / 9	9 / 9
0,01 ng	1,5 Zellen	9 / 9	7 / 9
0,005 ng	< 1 Zelle	5 / 9	3 / 9

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

Die Nachweisgrenze für die beiden Marker am CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System liegt bei insgesamt 3 Zellen (0,02 ng) in der Gesamtprobe.

Am cobas z 480 Analyzer liegt die Nachweisgrenze für die beiden Marker bei insgesamt 7,5 Zellen (0,05 ng) in der Gesamtprobe.

Die Quantifizierungsgrenzen des ScreenYu Gyn® Assays entsprechen den Nachweisgrenzen. Es ergibt sich eine Linearität von $R^2 = 0,99$ für beide Marker innerhalb der Quantifizierungsgrenzen.

Zudem wurde ein DNA-Gemisch aus methylierter Bisulfit-konvertierter, genomischer Human-DNA und unmethylierter, genomischer Human-DNA getestet. Dabei wurden jeweils 20 ng DNA bzw. 100 ng DNA pro Assay eingesetzt. Die Verdünnungsreihen wurden im Triplikat oder in 9-fach Bestimmung getestet.

Analytische Sensitivität – Teil 2

Anteil methylierte DNA	Gesamtmenge DNA	ScreenYu Gyn® positiv
10 %	20 ng	3 / 3
1 %	20 ng	9 / 9
0,1 %	20 ng	9 / 9
0,01 %	20 ng	4 / 9
0 %	20 ng	0 / 9
10 %	100 ng	3 / 3
1 %	100 ng	9 / 9
0,1 %	100 ng	9 / 9
0,01 %	100 ng	1 / 9
0 %	100 ng	0 / 9

Die Nachweisgrenze für ein positives Ergebnis des Marker ZNF671 liegt bei 0,1 % methylierte DNA für eine Probe mit insgesamt 20 ng DNA oder 100 ng DNA pro Assay.

12.1.2 Analytische Spezifität – Detektion unmethylierter DNA

Die analytische Spezifität des PCR-Assays wurde unter Verwendung von unmethylierter, das humane Genom repräsentierender 10 - 12 kb großer PCR-Fragmente ermittelt. Es erfolgte eine 5-fach Bestimmung. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Die Proben wurden durch den Marker ACTB als valide eingestuft. Bis zu einer Konzentration von 1000 ng unmethylierter, Bisulfit-konvertierter DNA (biDNA) wurde kein falsch-positives ScreenYu Gyn® Ergebnis erhalten.

Analytische Spezifität des PCR-Assays

Verwendete DNA	ZNF671 Cq ≤ 42	ACTB Cq ≤ 42
100 ng unmethylierte biDNA	0 / 5	5 / 5
250 ng unmethylierte biDNA	0 / 5	5 / 5
500 ng unmethylierte biDNA	0 / 5	5 / 5
1000 ng unmethylierte biDNA	0 / 5	5 / 5
1000 ng genomische DNA	0 / 5	0 / 5

12.2 Präzision

12.2.1 Wiederholbarkeit

Zwei Bisulfit-konvertierte Patientenproben wurden in zehn unabhängigen Durchführungen mit dem ScreenYu Gyn® Assay (je 4 Replikate) getestet. In allen 40 Bestimmungen wies die PAP I Probe ein negatives ScreenYu Gyn® Ergebnis und die CIN₃ ein positives ScreenYu Gyn® Ergebnis auf. Somit zeigen die Proben eine 100 %ige Wiederholbarkeit.

12.2.2 Reproduzierbarkeit

20 Patientenproben wurden an fünf Zentren mit ScreenYu Gyn® getestet. Jedes Mal wurde eine neue Probenvorbereitung und Bisulfitbehandlung von unterschiedlichen Personen durchgeführt sowie verschiedene qPCR-Geräte (cobas z 480 Analyzer, LightCycler® 480 I, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System) verwendet.

18 von 20 Patientenproben waren übereinstimmend. Es ergibt sich eine Reproduzierbarkeit von 90 %.

12.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit des ScreenYu Gyn® Assays wurde anhand von 15 Patientenproben mittels Sangersequenzierung überprüft. Negativ getestete Patientenproben zeigten keine methylierten Cytosine in der jeweiligen Genomregion und positiv getestete Patientenproben zeigten die korrekte ZNF671 Genomregion mit einem hohen Methylierungsgrad innerhalb der Sequenz.

12.4 Genauigkeit

Die Genauigkeit als Summe von Präzision und Richtigkeit des ScreenYu Gyn® Assays ist gegeben.

12.5 Robustheit

Es wurde keine Interferenz bei mit SiHa-Zellen gespikten Abstrichproben beobachtet, wenn erhöhte Konzentrationen folgender Substanzen in die Probe zugefügt wurden:

- bis zu 0,5 % Lugolsche Lösung
- bis zu 0,5 % Essigsäure

12.6 Cut-off

Der optimale Assay-Cut-off wurde anhand des sogenannten Youden's Index festgelegt. Für ein positives ScreenYu Gyn® Ergebnis müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

$\Delta Cq_{ZNF671-ACTB} \leq 10 \rightarrow$ ScreenYu Gyn® Ergebnis ist positiv

$\Delta Cq_{ZNF671-ACTB} > 10 \rightarrow$ ScreenYu Gyn® Ergebnis ist negativ

Cobas z 480 Analyzer

$\Delta Cp_{ZNF671-ACTB} \leq 9 \rightarrow$ ScreenYu Gyn® Ergebnis ist positiv

$\Delta Cp_{ZNF671-ACTB} > 9 \rightarrow$ ScreenYu Gyn® Ergebnis ist negativ

12.7 Klinische Leistungsbewertung

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

Die Bisulfitbehandlung der Patientenproben mit dem EZ DNA Methylation-Lightning Kit erfolgte mit einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 18.000 xg und einer Desulphonierungszeit von 20 Minuten.

Für die klinische Leistungsbewertung von ScreenYu Gyn® wurden 616 Patientenproben mit der folgenden Prävalenzverteilung der Befunde untersucht: Pap I (n = 380; 61,7 %), CIN 1 (n = 47; 7,6 %), CIN 2 (n = 50; 8,1 %), CIN 3 (n = 132; 21,4 %), Zervixkarzinom (n = 7; 1,1 %).

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

Klinische Leistungsbewertung von ScreenYu Gyn®

Befund nach Zytologie / Histologie	Erkennung	KI 95 %
Pap I (n = 380)	9,33 %	6,6 % - 12,7 %
CIN 1 (n = 47)	23,91 %	12,6 % - 38,8 %
CIN 2 (n = 50)	35,42 %	22,2 % - 50,5 %
CIN 3 (n = 132)	62,88 %	54,0 % - 71,1 %
CxCa (n = 7)	100,00 %	59,0 % - 100 %

Klinische Leistungsdaten CIN 3+ / Pap I	Wert	KI 95 %
Sensitivität	64,75 %	56,2 % - 72,7 %
Spezifität	90,67 %	87,3 % - 93,4 %
Positiver Vorhersagewert	72,00 %	63,3 % - 79,7 %
Negativer Vorhersagewert	87,40 %	83,7 % - 90,5 %
positiver Likelihood Ratio	6,96	-
negativer Likelihood Ratio	0,39	-

KI = Konfidenzintervall

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. Pipettiervolumina, 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 und Sonden 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 ScreenYu Gyn® 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 Epitype 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 Epitype GmbH.

Den technischen Support der Epitype 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 support@epitype.de.

Epitype GmbH

Moritzburger Weg 67

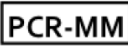
01109 Dresden, Deutschland

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

17 ZUSÄTZLICHE HINWEISE

- Regulatorischer Hinweis an Kunden in der Europäischen Union: Bitte beachten Sie Ihre Meldepflicht gegenüber der für Sie zuständigen Behörde und der Epitype 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 support@epitype.de 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		Vor Sonnenlicht schützen
	Chargenbezeichnung		Nicht wiederverwenden
	Bestellnummer		CE-Kennzeichnung

19 **ÄNDERUNGSVERZEICHNIS**

Vorversion (Freigabedatum)	Änderungen
6 (2025-4)	- Änderung des Firmennamens, der Adresse und der Kontaktdaten auf dem Deckblatt und in den Kapiteln 15, 16 und 17

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 ScreenYu Gyn® Kits. Die Bisulfitbehandlung der Proben muss mit dem EZ DNA Methylation-Lightning Kit (CE-IVD) durchgeführt werden (Bestellinformationen finden Sie in Kapitel 7).

Probenvorbereitung

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

Bisulfitbehandlung der Proben

- ☐ EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research Europe GmbH) laut Herstellerangaben vorbereiten
- ☐ Pellet resuspendieren
- ☐ Ansatz in 0,5 ml Reaktionsgefäß herstellen, vortexen und abzentrifugieren

Ansatz für die Bisulfit-Reaktion

Komponente	pro Reaktion
Lightning Conversion Reagent	130 µl
resuspendierte Probe	20 µl
Gesamtvolumen	150 µl

- ☐ Bisulfitbehandlung nach Herstellerangaben des EZ DNA Methylation-Lightning Kits durchführen und zusätzliche Schritte zwingend beachten:
- ☐ Durchfluss nach letztem Waschschrift verworfen
- ☐ Säule für 1 Minute im leeren Collection Tube bei full speed trocken zentrifugieren
- ☐ Säule in 1,5 ml Reaktionsgefäß umsetzen
- ☐ 15 µl M-Elution Buffer auf Säule pipettieren und 30 Sekunden bei 8.000 xg zentrifugieren

Vorbereitung und Pipettieren der PCR

- ☐ Probe abzentrifugieren
- ☐ ScreenYu Gyn® Mastermix vortexen und abzentrifugieren
- ☐ PCR-Deckel-Streifen von den ScreenYu Gyn® Strips abziehen und verworfen
- ☐ Pro Well 10 µl ScreenYu Gyn® Mastermix pipettieren
- ☐ 10 µl Probe bzw. ScreenYu Gyn® Positive Control (in Well A1) bzw. ScreenYu Gyn® Water (in Well B1) pipettieren
- ☐ ScreenYu Gyn® Strips mit den unbenutzten ScreenYu Gyn® Caps verschließen (transparenter Druckverschlussbeutel)
- ☐ ScreenYu Gyn® Strips vortexen und zentrifugieren

Durchführung der PCR

- ☐ Real-time PCR-Gerät einschalten, gegebenenfalls Software öffnen und ScreenYu Gyn Template wählen
- ☐ PCR-Lauf individuell benennen, Plattenlayout bearbeiten, Temperaturprotokoll überprüfen

PCR-Temperaturprotokoll

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

- ☐ ScreenYu Gyn® Strips und Balance Strips in das Gerät stellen und PCR-Lauf starten

Auswertung und Interpretation der PCR-Daten

- ☐ Öffnen der exportierten Datei und Daten in einem geeigneten Tabellenkalkulationsprogramm zusammenführen
- ☐ Formatierung der Daten, sodass die Ergebnisse der verschiedenen Proben untereinander und die Marker ZNF671 und ACTB nebeneinander dargestellt werden
- ☐ Überprüfen der Ergebnisse der Positivkontrolle und Negativkontrolle für beide Marker
- ☐ Bewertung des Ergebnisses für die durchgeführten Proben

Der ScreenYu Gyn® Assay gilt für eine Probe als positiv, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Validitäts- und Positivitätskriterien

PCR-Gerät	Marker	Ct-Wert	$\Delta Ct_{ZNF671 - ACTB}$
cobas z 480 Analyzer	ACTB	$\geq 20, \leq 32$	-
	ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 9,00$
CFX96 Real-Time PCR Detection System	ACTB	$\geq 20, \leq 32$	-
	ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	$\leq 10,00$

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