



# GynTect®

UDI-DI básico: 426076785GYNTECTYM

## Instrucciones de uso

**REF**



**UDI-DI**

GT003-06

6 muestras

4260767851017

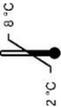
GT003-10

10 muestras

4260767851116



Lea detenidamente estas instrucciones antes de realizar la prueba GynTect®. Siga exactamente las instrucciones para garantizar la fiabilidad de los resultados de la prueba.



GynTect® es un kit molecular de diagnóstico *in vitro*, que analiza la presencia de seis marcadores epigenéticos mediante la conversión de bisulfito del ADN extraído a partir de las muestras cervicales de pacientes con un resultado VPH+ (para el virus del papilomavirus humano) o con un test de Papanicolaou incierto. Un resultado positivo de GynTect® sugiere la presencia de una neoplasia intraepitelial en el cérvix uterino o de un carcinoma cervical.

Solo para uso en diagnóstico *in vitro* por parte de personal cualificado.

Revisión 6 (septiembre de 2024)  
Traducción publicada en octubre de 2024



oncnostics GmbH  
Löbstedter Straße 41 • 07749 Jena • Alemania  
Teléfono: +49 (0) 3641 5548500  
contact@oncnostics.com • www.oncnostics.com





## ENVÍO Y ALMACENAMIENTO

El kit GynTect® se envía a temperatura ambiente. El límite de temperatura se controla mediante un punto de medición de la temperatura. Por favor, observe los cambios de color del punto de medición directamente a la llegada del kit (véase la Figura 1) y compruebe si el embalaje secundario, el precinto y el embalaje primario están intactos. Una vez recibido, el kit se debe enfriar inmediatamente a entre 2 °C y 8 °C y almacenarse al abrigo de la luz. El envío correcto y el almacenamiento adecuado permiten usar el kit GynTect® y todos sus componentes hasta la fecha de caducidad indicada. En estas condiciones de almacenamiento, la fecha de caducidad se refiere a los reactivos GynTect® abiertos.



Figura 1 Vigilancia de la temperatura de transporte

El punto de medición de la temperatura del kit GynTect® permite vigilar la temperatura durante el transporte. El cuadrado plateado brillante en el centro del punto indica que la temperatura durante el transporte no ha superado la temperatura de transporte permitida. Por el contrario, un cuadrado negro indica que se ha superado durante el transporte la temperatura permitida, por lo que ya no se pueden garantizar las características de funcionamiento del kit GynTect®. En ese caso, póngase en contacto con oncnostics GmbH.

## ÍNDICE

1.	Finalidad prevista .....	5
2.	Importancia clínica .....	5
3.	Principio de del método de ensayo.....	5
4.	Diseño del ensayo GynTect® .....	7
4.1.	Disposición de las GynTect® Strips .....	7
4.2.	Controles .....	7
4.2.1.	Control de calidad del tratamiento con bisulfito (ACHE) .....	7
4.2.2.	Control de calidad de la metilación (IDS-M) .....	8
4.2.3.	Control positivo.....	8
4.2.4.	Control negativo .....	8
5.	Material de referencia .....	8
6.	Contenido del kit.....	8
7.	Consumibles y equipamiento (no incluidos en el kit) .....	9
8.	Almacenamiento y vida útil.....	10
9.	Instrucciones de seguridad.....	10
9.1.	Información general.....	10
9.2.	División espacial.....	11
9.3.	Cómo evitar la contaminación.....	12
9.4.	Instrucciones de manipulación .....	12
10.	Eliminación .....	12
11.	El procedimiento GynTect® .....	13
11.1.	Cronograma del flujo de trabajo.....	13
11.2.	Muestreo.....	13

11.3.	Preparación de la muestra.....	14
11.4.	Tratamiento de las muestras con bisulfito.....	14
11.4.1.	Conversión del ADN por bisulfito .....	14
11.4.2.	Purificación del ADN convertido .....	16
11.5.	PCR.....	17
11.5.1.	Preparación y pipeteo de la PCR.....	17
11.5.2.	Realización de la PCR en el cobas z 480 Analyzer .....	20
11.5.3.	Realización de la PCR en el CFX96 Real-Time PCR Detection System .....	23
11.6.	Evaluación e interpretación de los datos de PCR .....	26
12.	Rendimiento de GynTect® .....	29
12.1.	Rendimiento analítico .....	29
12.1.1.	Sensibilidad analítica: detección de ADN metilado .....	29
12.1.2.	Especificidad analítica: detección de ADN no metilado.....	30
12.2.	Precisión .....	31
12.2.1.	Repetibilidad.....	31
12.2.2.	Reproducibilidad .....	31
12.3.	Robustez.....	31
12.4.	Rendimiento clínico .....	32
13.	Límites del procedimiento .....	33
14.	Referencias .....	33
15.	Responsabilidad.....	34
16.	Preguntas y problemas .....	34
17.	Notas adicionales.....	35
18.	Significado de los símbolos .....	35
19.	Lista de cambios .....	36
20.	Protocolo breve.....	36

## **1. FINALIDAD PREVISTA**

GynTect® es un kit molecular de diagnóstico *in vitro*, que analiza la presencia de seis marcadores epigenéticos mediante la conversión de bisulfito del ADN extraído a partir de las muestras cervicales de pacientes con un resultado VPH+ (para el virus del papilomavirus humano) o con un test de Papanicolaou incierto. Un resultado positivo de GynTect® sugiere la presencia de una neoplasia intraepitelial en el cérvix uterino o de un carcinoma cervical.

El uso de GynTect® solo debe correr a cargo de personal cualificado que esté familiarizado con las técnicas de biología molecular.

## **2. IMPORTANCIA CLÍNICA**

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más frecuente en las mujeres de todo el mundo, con más de 600 000 casos nuevos diagnosticados al año [1]. En casi todos los casos de cáncer de cuello uterino se observa una infección persistente por un virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo [2], lo que demuestra que la infección por el VPH es un requisito previo para la carcinogénesis cervical. Las mujeres con pruebas negativas para el VPH solo tienen un riesgo extremadamente bajo de desarrollar cáncer de cuello uterino. No obstante, la mayoría de las mujeres con pruebas positivas para el VPH tampoco desarrollan una lesión precancerosa ni cáncer. Solo alrededor del 15 % de las mujeres infectadas por el VPH pueden desarrollar una lesión precancerosa cervical de este tipo [3].

Las pacientes con un resultado positivo en la prueba del VPH o con resultados poco claros en la prueba de Papanicolaou (Pap II, Pap III y Pap IIID1 y D2) pueden recibir la recomendación de someterse a una prueba de triaje como GynTect®, que permite estimar la probabilidad de prevalencia de una enfermedad cancerosa cervical que pueda requerir tratamiento.

El resultado de GynTect® no se debe utilizar para tomar una decisión terapéutica definitiva, sino que se debe evaluar en combinación con otros hallazgos clínicos.

## **3. PRINCIPIO DE DEL MÉTODO DE ENSAYO**

GynTect® se basa en la detección de biomarcadores epigenéticos, más concretamente metilaciones de regiones específicas del ADN, que se correlacionan con la existencia de lesiones precancerosas o carcinomas cervicales [4, 5, 6]. Además, se analiza un marcador de referencia específico de bisulfito, así como uno específico de metilación. Las regiones marcadoras aplicadas en GynTect® se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de las regiones marcadoras de GynTect®

Denominación en el protocolo	Región marcadora (nombre del gen)
Marcador de metilación	ASTN <sub>1</sub>
	DLX <sub>1</sub>
	ITGA <sub>4</sub>
	RXFP <sub>3</sub>
	SOX <sub>17</sub>
	ZNF6 <sub>71</sub>
Marcador de control	ACHE
	IDS

La detección del marcador se realiza mediante PCR en tiempo real de alta sensibilidad. Los instrumentos de tiempo real ofrecen el valor C<sub>p</sub> (punto de cruce, cobas z 480 Analyzer) o el valor C<sub>q</sub> (cuantificación del ciclo, CFX96 Real-Time PCR Detection System), que se corresponden ambos con el valor C<sub>t</sub> del umbral del ciclo y así se denominan también en lo sucesivo. Este valor se corresponde con el ciclo en una PCR en tiempo real en el que la fluorescencia se eleva por encima de un valor umbral definido por primera vez.

El análisis de la muestra de una paciente con GynTect® consta de dos pasos.

En primer lugar, el ADN del frotis cervical se trata mediante una reacción de bisulfito que produce una «fijación» de la metilación del ADN. Para la purificación que se realiza tras la conversión por bisulfito recomendamos un protocolo más corto y simplificado. Tras la elución, el ADN se diluye con agua. En el segundo paso, el ADN convertido por bisulfito se analiza mediante ocho reacciones de PCR en tiempo real específicas de la metilación singleplex. Las regiones del ADN originalmente metiladas se amplifican selectivamente utilizando cebadores que se colocan en los tubos de una tira de PCR de ocho tubos.

La detección en tiempo real del marcador de metilación y de las regiones de control se realiza utilizando un colorante fluorescente intercalante. Además, se lleva a cabo un control positivo y otro negativo para controlar la PCR. Posteriormente se realiza el análisis específico del ensayo.

El kit de muestreo y el kit de bisulfito no forman parte del kit GynTect®. Los productos especiales para el muestreo y el tratamiento con bisulfito están disponibles por separado.

El principio de funcionamiento de la prueba se muestra en la Figura 2.

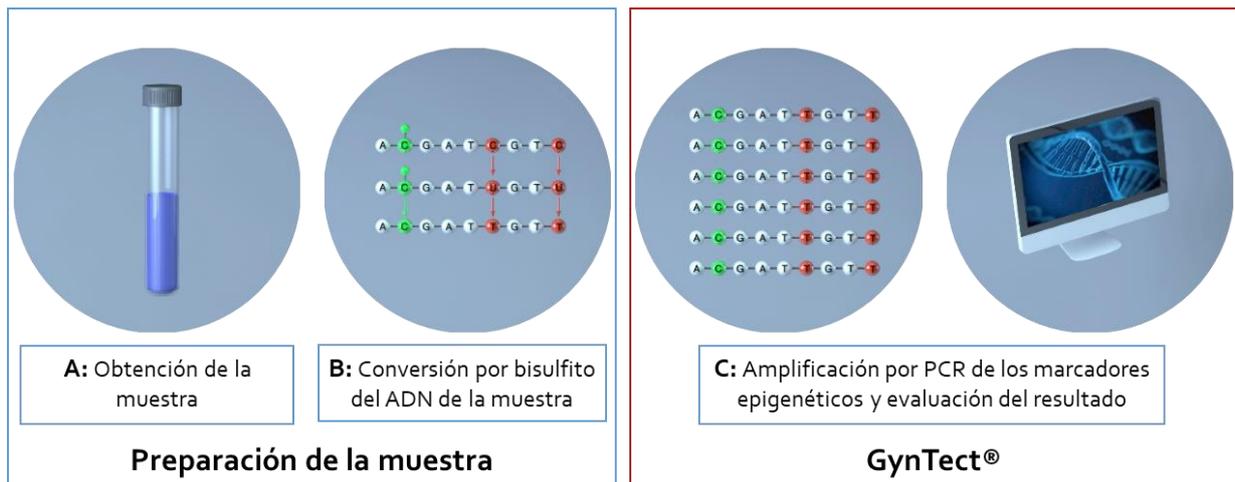


Figura 2 Principio de funcionamiento de la prueba

A: el ginecólogo toma en el cuello uterino de la paciente un frotis que se transfiere a un medio de muestreo.

B: el laboratorio de diagnóstico realiza la conversión por bisulfito de la muestra de la paciente.

C: para cada muestra se realizan ocho reacciones PCR singleplex. La evaluación se realiza mediante la detección del colorante fluorescente intercalante contenido en la mezcla maestra y los picos definidos de la curva de fusión.

## 4. DISEÑO DEL ENSAYO GYNTECT®

### 4.1. Disposición de las GynTect® Strips

Cada GynTect® Strip contiene ocho pares de cebadores para la amplificación de seis marcadores específicos de metilación y dos marcadores de control. La disposición de las GynTect® Strips se muestra en la Figura 3.

Se requiere una GynTect® Strip completa para el análisis de la muestra de una sola paciente.



Figura 3 Disposición de las GynTect® Strips

Cada posición 1-6 de las tiras de PCR contiene el cebador para uno de los seis marcadores específicos de metilación. La posición 7 de las tiras contiene los cebadores para el control de calidad de bisulfito (ACHE) y la posición 8, los cebadores para el control de calidad de metilación (IDS-M).

### 4.2. Controles

El diseño del kit GynTect® incluye varios controles. Estos permiten vigilar los pasos críticos de la prueba, incluida la calidad de la muestra y el tratamiento con bisulfito (ACHE), el estado de metilación de la muestra (IDS-M) y la calidad de las reacciones de PCR.

#### 4.2.1. Control de calidad del tratamiento con bisulfito (ACHE)

Este marcador de control verifica la conversión en uracilo satisfactoria de todos los residuos de citosina no metilados y, por tanto, la calidad del tratamiento con bisulfito. Para ello, se amplifica una región de ADN localizada en la acetilcolina esterasa humana (ACHE). Una amplificación inadecuada de la ACHE indica que el ensayo no es válido y se debe repetir.

#### 4.2.2. Control de calidad de la metilación (IDS-M)

Este control permite la amplificación del gen impreso IDS, que está metilado en el segundo cromosoma X femenino (IDS-M). Si en la reacción de la PCR se genera un valor C<sub>p</sub> de entre 20 y 32, la muestra cervical es válida. Si no se consigue ninguna amplificación, el ensayo se debe considerar como inválido y es necesario repetirlo.

#### 4.2.3. Control positivo

Se proporciona una plantilla de control para vigilar la calidad de la reacción de PCR. Durante la amplificación de la plantilla de control GynTect® Control Positivo (PC), cada uno de los ocho marcadores debe proporcionar un valor C<sub>p</sub> inferior a 38. De lo contrario, las reacciones de PCR no serán válidas y se deberán repetir.

#### 4.2.4. Control negativo

Como control negativo se realizan reacciones con la plantilla GynTect® Water (NTC - No Template Control). Estas reacciones deben ser negativas para todos los marcadores. Si aparecen productos de reacción específicos en alguna de las reacciones, es posible que se hayan producido contaminaciones y que haya que repetir GynTect®.

## 5. MATERIAL DE REFERENCIA

No se dispone de material de referencia internacional.

## 6. CONTENIDO DEL KIT

Tabla 2 Contenido del kit GynTect®

Componente	Símbolo	Contenido	Volumen/cantidad	
			GT003-06	GT003-10
GynTect® Mastermix	<b>PCR-MM</b>	2x mastermix PCR <sup>1</sup>	1 x 1,1 ml	1 x 1,1 ml
GynTect® Strips	<b>STRIPS</b>	Tiras de PCR <sup>2</sup> para muestras de pacientes (tapones verdes)	6 tiras	10 tiras
		Tiras de PCR <sup>2</sup> para controles positivos (tapones rojos)	3 tiras	1 tira
		Tiras de PCR <sup>2</sup> para controles negativos (tapones amarillos)	3 tiras	1 tira
GynTect® Caps	<b>CAPS</b>	Tiras de tapones de PCR	12 tiras	12 tiras
GynTect® Positive Control	<b>CONTROL+</b>	Control positivo	1 x 260 µl	1 x 90 µl
GynTect® Water	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua	1 x 2 ml	1 x 2 ml
Instrucciones de uso	-	Instrucciones de uso	1	1

<sup>1</sup> Contiene todos los componentes necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a excepción del cebador y la plantilla.

<sup>2</sup> Contiene los cebadores necesarios para la PCR.

## 7. CONSUMIBLES Y EQUIPAMIENTO (NO INCLUIDOS EN EL KIT)

GynTect® solo se puede realizar utilizando el material y el equipo indicados y su uso solo se puede confiar a personal cualificado. Todo el material de laboratorio debe instalarse, someterse a mantenimiento, manipularse y calibrarse según las instrucciones del fabricante.

La temperatura ambiente se define como una temperatura entre 15 °C y 30 °C.

Tabla 3 Equipamiento necesario

Equipamiento	N.º de catálogo	Pedido
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) *	Z102	order@oncgnostics.com
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	-	de Hologic Inc.
Cervex-Brush® o Cervex-Brush® Combi	-	de Rovers Medical Devices

\* El EpiTect® **Fast** Bisulfite Kit (n.º de catálogo QIAGEN: 59802) no se debe confundir con el EpiTect® Bisulfite Kit.

Para realizar el ensayo GynTect® se necesita el siguiente equipo de laboratorio y material fungible.

- Centrifugadora para tubos de reacción de 0,5 ml / 1,5 ml,  $\geq 10\ 000\ xg$
- Centrifugadora para tiras de PCR
- Termociclador para tubos de reacción de 0,5 ml
- Mezclador vórtex / agitador
- Pipetas con diferentes rangos de volumen y puntas con filtro asociadas (estériles, sin DNasa)
- Tubos de reacción para 0,5 ml / 1,5 ml (sin DNasa)
- Soporte para tubos de reacción de 0,5 ml / 1,5 ml
- Etanol 96-100 %, sin desnaturalizar
- Dispositivo de PCR en tiempo real, canal de detección para FAM/SYBR Green

GynTect® se ha validado en:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) con bloque de 96 pocillos, adaptador para tiras de PCR y LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0 (Service Pack 3), evaluación con la versión 1.5.1.62
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con software CFX Maestro de la versión 2.3
- CFX Opus 96 (Dx) Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con software CFX Maestro de la versión 2.3

## 8. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Si se transporta y se almacena correctamente, el kit GynTect® y sus componentes se pueden utilizar hasta la fecha indicada. Todos los reactivos contenidos en el kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada tras su apertura, siempre que se almacenen en las condiciones indicadas y se protejan de una posible contaminación (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Temperatura de almacenamiento del kit GynTect® y equipamiento no incluido en el kit

Equipamiento	Temperatura de almacenamiento
GynTect® Kit	Entre 2 °C y 8 °C
EpiTect® Fast Bisulfite (10) Kit salvo de	Entre 15 °C y 25 °C
Spin Columns, DNA Protect Buffer, Buffer BD	Entre 2 °C y 8 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	Entre 15 °C y 30 °C
Cervex-Brush® o Cervex-Brush® Combi	Entre 15 °C y 30 °C

## 9. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

### 9.1. Información general

A la hora de establecer métodos de biología molecular de última generación se deben seguir al pie de la letra las instrucciones que se indican a continuación para garantizar la máxima seguridad del personal de laboratorio y obtener resultados de alta calidad:

- Dado que implica procesos de biología molecular como el tratamiento con bisulfito y la amplificación y la detección de ADN, este kit está destinado exclusivamente al diagnóstico *in vitro* y debe ser utilizado solo por personal con formación en prácticas de laboratorio para el diagnóstico *in vitro*.
- Antes de utilizar el producto, lea detenidamente las instrucciones de uso. Solo se debe tener en cuenta la versión actual.
- Lleve puesta una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y, si es necesario, gafas de seguridad para cada paso.
- Evite el contacto directo con las muestras biológicas, así como salpicaduras o pulverizaciones de las mismas.
- La tapa calentada y el bloque de incubación del termociclador pueden alcanzar temperaturas de hasta 110 °C. Existe riesgo de quemaduras en la piel. Tenga en cuenta las instrucciones de uso del dispositivo.
- Lávese bien las manos después de manipular muestras y reactivos.
- No utilice GynTect® si el envase del reactivo está dañado. Póngase en contacto con su distribuidor.
- No utilice el kit GynTect® después de la fecha de caducidad y no utilice reactivos caducados.

- No mezcle reactivos de lotes diferentes ni mezcle reactivos del kit con reactivos de otros fabricantes.
- Utilice solo los materiales suministrados con el kit o los recomendados por el fabricante.
- Todo el material de laboratorio necesario debe instalarse, calibrarse, manipularse y someterse a mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- El pipeteo de pequeños volúmenes de líquido dentro del rango de los microlitros requiere una cierta práctica. Asegúrese de pipetear los volúmenes necesarios con las micropipetas con la mayor precisión posible.
- Se deben cumplir los requisitos normativos aplicables al operador.
- Se presupone el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) tal y como las definen por ejemplo la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) o la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). En concreto, se deben tener en cuenta las recomendaciones para la realización de pruebas de amplificación molecular.
- El buen funcionamiento de los dispositivos de PCR solo está garantizado a temperatura ambiente.

## 9.2. División espacial

Debido a la alta sensibilidad analítica de la PCR, se debe prestar la máxima atención a preservar la pureza de los componentes del kit y de las muestras.

La PCR multiplica secciones del ADN de la muestra en un rango entre millones y miles de millones de veces. Incluso las cantidades más pequeñas de estos productos de la PCR (por ejemplo, también diseminados en forma de aerosol) pueden dar lugar a un resultado falso si se arrastran al material de la muestra, a los reactivos para el tratamiento con bisulfito o a los reactivos de la PCR que contiene este kit.

Por lo tanto, un flujo de trabajo limpio y bien estructurado es crucial para evitar resultados incorrectos. Para ello es necesario separar entre sí las áreas de laboratorio para la fase previa a la PCR y la fase posterior a la PCR. Debe haber equipos, material fungible, batas de laboratorio y guantes por separado en cada área. No transfiera nunca de una zona a otra batas de laboratorio, guantes o equipos. La Figura 4 muestra un ejemplo de un laboratorio dividido en dos salas separadas. Una zona está destinada solo al tratamiento con bisulfito y a la preparación de la PCR, mientras que en la otra se lleva a cabo la propia PCR.

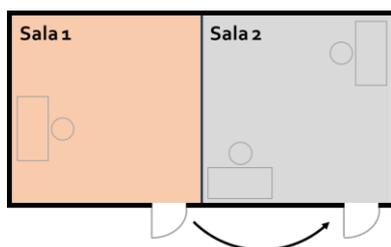


Figura 4 División espacial

En la sala 1 se realiza el tratamiento con bisulfito y la preparación de la PCR (lo ideal es utilizar una campana de PCR). En la sala 2 se realiza la PCR en sí, se detectan los marcadores y se analizan los resultados.

### **9.3. Cómo evitar la contaminación**

- Se debe llevar puesta una bata de laboratorio y guantes desechables durante todos los pasos.
- Los guantes desechables se deben sustituir con frecuencia y siempre después de una (presunta) contaminación con reactivos o material de muestra.
- Todas las superficies, equipos y suministros se deben descontaminar con una solución de limpieza adecuada (agentes destructores del ADN).
- No toque el interior de los tubos de reacción ni sus tapones.
- Al pipetear hay que utilizar siempre puntas con filtro (carentes de DNasa, RNasa y ADN humano) para descartar una posible contaminación cruzada a través de los aerosoles generados durante el pipeteo. Las puntas se deben cambiar siempre entre los distintos pasos del pipeteo.
- Es importante realizar controles negativos para detectar posibles contaminaciones.

### **9.4. Instrucciones de manipulación**

- Guarde los componentes no utilizados en el envase original hasta su uso.
- Todos los pasos de centrifugación se deben realizar a temperatura ambiente.
- El flujo de trabajo se puede interrumpir después del tratamiento con bisulfito. En este punto, las muestras se pueden almacenar durante una semana a entre 2 °C y 8 °C o hasta dos meses a entre -15 °C y -30 °C.
- No toque nunca el interior de los tapones de color de las tiras de PCR al retirarlos de ellas y deséchelos de forma profesional.
- Las GynTect® Strips y los GynTect® Caps no se deben tocar sin guantes desechables en ningún momento del procedimiento, ya que de lo contrario se podrían producir señales de fluorescencia inespecíficas.
- El etiquetado de las GynTect® Strips y los GynTect® Caps en posiciones incorrectas puede dar lugar a señales de fluorescencia inespecíficas durante las ejecuciones de PCR.
- Las GynTect® Strips y los GynTect® Caps están destinados a un solo uso y no se pueden reutilizar.
- Conserve en su envase original las GynTect® Strips y los GynTect® Caps no utilizados.

## **10. ELIMINACIÓN**

El kit GynTect® no utilizado y sus componentes se pueden desechar sin precauciones especiales. Las muestras de pacientes y los tubos de reacción usados se deben tratar como residuos infecciosos. Todos los reactivos se deben desechar cumpliendo la normativa legal.

## 11. EL PROCEDIMIENTO GYNTECT®

El siguiente capítulo contiene una descripción detallada de los distintos pasos del procedimiento, desde la toma de muestras hasta el análisis de los datos. El kit GynTect® GT003-10 contiene un control positivo y un control negativo respectivamente para una sola ejecución de GynTect®. Las diez muestras se deben usar en un solo flujo de trabajo.

### 11.1. Cronograma del flujo de trabajo

GynTect® se puede procesar en menos de cuatro horas en total, y el tiempo de manipulación activa es de unas dos horas. Antes de realizar el primer ensayo GynTect® debe reservar unos 15 minutos para configurar un programa de plantilla de PCR para el ensayo.

La Figura 5 muestra los detalles del flujo de trabajo.

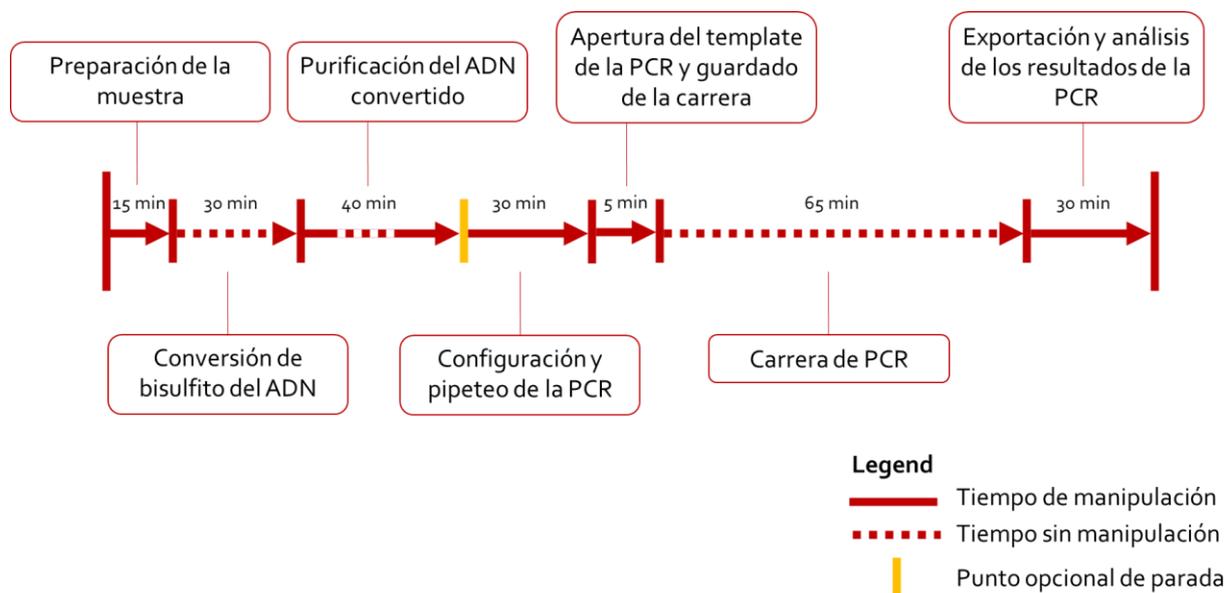


Figura 5 Cronograma del flujo de trabajo de GynTect®

### 11.2. Muestreo

El kit de muestreo y el kit de bisulfito no forman parte del kit GynTect®. El vial de solución ThinPrep® PreservCyt® (Hologic) y el Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) se pueden adquirir de sus respectivos fabricantes. La recogida de una muestra cervical por parte del médico se debe realizar según las instrucciones del fabricante y garantizando el cumplimiento de las directrices generalmente aceptadas para la recogida de una muestra de frotis cervical [7].

**Importante:** El cepillo se debe desechar después de la toma de la muestra y no debe permanecer en el medio de la muestra, ya que de lo contrario se verá afectado el rendimiento de GynTect®.

Se debe utilizar como medio de frotis la solución ThinPrep® PreservCyt®. El uso de otros medios de muestra no forma parte de la validación del ensayo GynTect®.

Garantizar la buena calidad de la muestra de ADN empleada es un requisito previo importante para la validez del ensayo. Si no se realiza adecuadamente la toma de muestras, el tratamiento con bisulfito y el almacenamiento del ADN, se pueden obtener resultados inválidos o incluso falsos negativos.

Las muestras cervicales se pueden transportar al laboratorio sin refrigeración para su análisis. Las muestras se pueden almacenar durante hasta 1,5 años a una temperatura de entre 2 °C y 30 °C.

### 11.3. Preparación de la muestra

Los siguientes pasos se deben llevar a cabo en la zona de preparación de muestras (sala 1).

**Importante:** El cepillo se debe desechar antes de procesar la muestra si aún está colocado en el vial de muestreo.

1. Agite en vórtex la muestra de una paciente durante 5 segundos a velocidad máxima y transfiera inmediatamente 1 ml de la muestra a un tubo de 1,5 ml.

**Atención:** Las células se depositan en el fondo del vial muy rápidamente. La muestra de la paciente se debe utilizar en un plazo de 10 segundos tras la mezcla.

2. Centrifugue la muestra durante 5 minutos a 10 000 xg.
3. Retire con cuidado 900 µl de sobrenadante por encima del precipitado. No retire ni destruya el precipitado.

**Atención:** El precipitado se fija más o menos dependiendo de la muestra.

4. Agite en vórtex el precipitado durante 3 segundos para volver a resuspenderlo. Se utilizan 40 µl de muestra resuspendida para el tratamiento con bisulfito.

### 11.4. Tratamiento de las muestras con bisulfito

El kit de bisulfito no forma parte del kit GynTect®. GynTect® se ha validado con el EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen).

**Atención:** El protocolo original del EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen) se ha modificado. La utilización de este protocolo modificado es un requisito previo para cumplir los parámetros de rendimiento indicados.

#### 11.4.1. Conversión del ADN por bisulfito

1. Prepare los tampones del kit de bisulfito que vaya a utilizar según la Tabla 5.

**Importante:** El **Buffer BL** se utiliza sin *Carrier ARN*. Cuando el **Buffer BL** se almacena o se transporta a bajas temperaturas es posible que se formen precipitados. En ese caso, disuelva la precipitación mediante el calentamiento suave (37 °C) y la agitación del **Buffer BL**.

Tabla 5 Buffer para el EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Buffer	Adición de etanol	Temperatura de almacenamiento
Buffer BL *	-	Temperatura ambiente
Buffer BW	30 ml de etanol (96-100 %)	Temperatura ambiente
Buffer BD	27 ml de etanol (96-100 %)	Entre 2 °C y 8 °C

\* No añadir *Carrier ARN*, control de calidad (véase la nota)

2. Prepare para cada muestra una mezcla de reacción de tratamiento con bisulfito utilizando tubos de 0,5 ml según la Tabla 6.

**Importante:** Cuando la **Bisulfite Solution** se almacena o se transporta a bajas temperaturas es posible que se formen precipitados. En ese caso, disuelva la precipitación mediante el calentamiento suave (37 °C) y la agitación de la **Bisulfite Solution**.

Tabla 6 Preparación para el tratamiento con bisulfito

Compuesto	Por reacción
Bisulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Muestra preparada y resuspendida	40 µl
Volumen total por reacción	140 µl

\* Control de calidad (véase la nota)

**Atención:** La **Bisulfite Solution** no se puede almacenar. Una **Bisulfite Solution** solo se puede utilizar para un proceso, y los restos se deben desechar.

3. Agite en vórtex la mezcla de reacción para la conversión por bisulfito durante tres segundos a velocidad máxima, centrifúguela brevemente y déjela a temperatura ambiente hasta su uso posterior.

**Atención:** El **DNA Protect Buffer** cambia su color de verde a azul si el pH de la mezcla está en el rango correcto. La muestra se debe procesar en un plazo de 60 minutos.

4. Utilice un termociclador con tapa calefactada (100 °C) y programe el termociclador de acuerdo con la Tabla 7.

**Importante:** Si el termociclador no acepta un volumen tan grande como 140 µl, utilice el siguiente volumen programable posible. No es necesario precalentar la tapa antes de iniciar la conversión.

Tabla 7 Conversión por bisulfito utilizando un termociclador

Paso	Duración	Temperatura
Desnaturalización	5 min.	95 °C
Incubación	10 min.	60 °C
Desnaturalización	5 min.	95 °C
Incubación	10 min.	60 °C
Fin de la reacción	Retener *	20 °C

\* El ADN convertido puede permanecer en el termociclador o almacenarse a temperatura ambiente durante toda la noche (máx. 16 h).

5. Coloque los tubos de 0,5 ml en el bloque de calentamiento del termociclador e inicie la incubación.

**Atención:** Tras la conversión por bisulfito, las muestras se pueden almacenar por la noche a temperatura ambiente (máx. 16 h). Evite el almacenamiento refrigerado (a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C), ya que las muestras pueden precipitar, lo que impide su posterior procesamiento.

#### 11.4.2. Purificación del ADN convertido

6. Una vez finalizada la conversión por bisulfito, agite en vórtex el tubo de PCR durante tres segundos a velocidad máxima y centrifugue brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.

7. Añada **310 µl de Buffer BL** a cada columna de centrifugación MinElute® Spin Column.

**Importante:** Etiquete claramente la MinElute® Spin Column.

8. Añada la muestra (140 µl) a la columna de centrifugación y mézclela brevemente pipeteando cinco veces hacia arriba y hacia abajo.

**Importante:** No toque la membrana de la columna con la punta de la pipeta y evite la formación de burbujas. Asegúrese de que la solución es homogénea y que no presenta estrías tras cinco pipeteos arriba y abajo.

9. Añada **250 µl de etanol** (96-100 %) a cada columna de centrifugación, cierre la tapa y mezcle brevemente poniendo cinco veces el pivote de la columna boca arriba (180°).

10. Centrifugue cada columna de centrifugación durante 30 segundos a 18 000 xg y asegúrese de que el líquido ha pasado de la columna al Collection Tube.

11. Retire la columna de centrifugación de la centrifugadora, deseche el flujo y vuelva a colocar la columna de centrifugación en el Collection Tube.

12. Para el lavado, añada **200 µl de Buffer BW** a la columna de centrifugación y centrifugue durante 30 segundos a 18 000 xg.

13. Añada **200 µl de Buffer BD** a cada columna de centrifugación, cierre la tapa e incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-30 °C).

14. Una vez finalizada la desulfonación, centrifugue la columna de centrifugación durante 30 segundos a 18 000 xg.

15. Añada **200 µl de Buffer BW** y centrifugue durante 30 segundos a 18 000 xg.

16. Retire la columna de centrifugación de la centrifugadora, deseche el flujo y vuelva a colocar la columna de centrifugación en el Collection Tube.

17. Lave la columna de centrifugación con **400 µl de Buffer BW** y centrifugue durante 30 segundos a 18 000 xg.

18. Añada **200 µl de etanol** (96-100 %) a cada columna de centrifugación y centrifugue durante 30 segundos a 18 000 xg.

19. Coloque la columna de centrifugación en un nuevo Collection Tube de 2 ml y centrifugue durante 60 segundos a 18 000 xg para eliminar cualquier líquido residual.

**Atención:** No omita este paso, ya que el etanol residual puede perjudicar el rendimiento del ensayo GynTect®.

20. Coloque la columna de centrifugación en un tubo limpio de 1,5 ml (no suministrado), añada 20 µl de agua directamente en el centro de la membrana de la columna de centrifugación y cierre la tapa con cuidado.

**Importante:** No dañe la membrana de la columna de centrifugación y no pipetee el agua en el lateral de la columna de centrifugación.

21. Incube la columna de centrifugación a temperatura ambiente durante 60 segundos y a continuación centrifugue la columna de centrifugación durante 60 segundos a 8000 ×g (elución).
22. Compruebe visualmente que el eluido tenga el volumen correcto.

**Opcional:** En esta fase, las muestras se pueden conservar durante hasta una semana a entre 2 °C y 8 °C o hasta dos meses a entre - 15 °C y - 30 °C.

### 11.5. PCR

Antes de iniciar la PCR, asegúrese de que el protocolo de temperatura de la PCR está programado en el dispositivo de PCR en tiempo real adecuado a fin de minimizar el tiempo entre la preparación y el inicio de la PCR. Para establecer el programa de PCR en el cobas z 480 Analyzer, proceda como se describe en la página 20. La explicación para la PCR en el CFX96 Real-Time PCR Detection System figura a partir de la página 23.

#### 11.5.1. Preparación y pipeteo de la PCR

**Importante:** La preparación y el pipeteo de la PCR no deben durar más de 60 minutos. Este paso se realiza en la sala 1 (área de la fase previa a la PCR).

Tenga en cuenta la disposición de placa descrita en la página 20 o 23 respectivamente. El control positivo (PC) se debe colocar en la fila 11 y el control negativo (NTC) en la fila 12.

1. Añada a cada muestra 70 µl de **GynTect® Water**.
2. Agite las muestras en vórtex durante tres segundos a velocidad máxima y centrifúguelas brevemente.
3. Saque el **GynTect® Mastermix** del kit y utilice para cada muestra una **GynTect® Strip** (tapa verde) y para cada control una **GynTect® Strip** (control positivo: tapa roja, controles negativos: tapa amarilla).
4. Coloque las **GynTect® Strips** en una gradilla para PCR. Tenga en cuenta la orientación de las **GynTect® Strips** (véase la Figura 6).

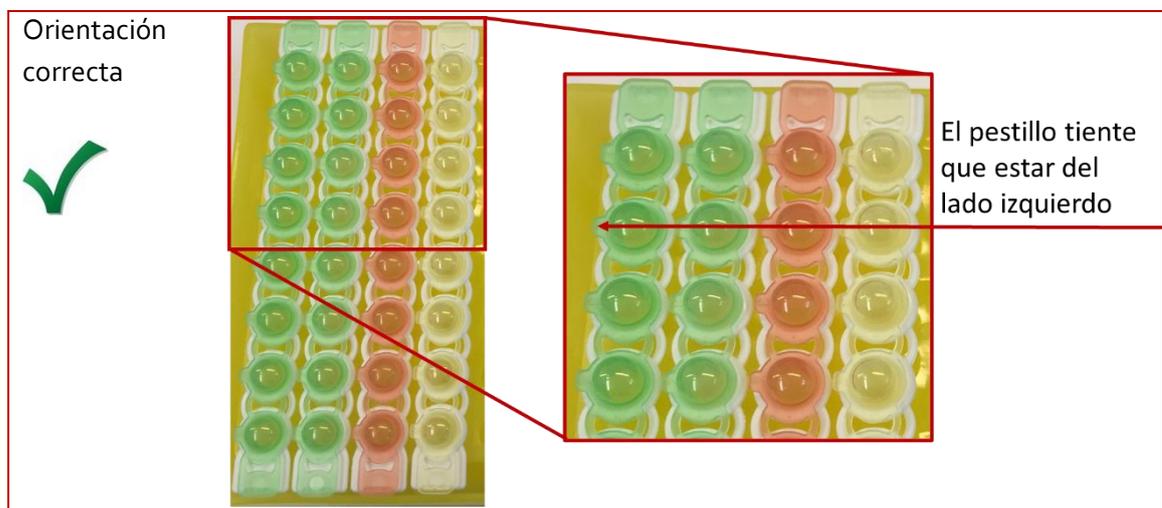


Figura 6 Orientación de las GynTect® Strips

5. Agite en vórtex el **GynTect® Mastermix** durante tres segundos a velocidad máxima y centrifugue brevemente.
6. Retire las tiras de color y de tapón redondo de la **GynTect® Strip** y deséchelas.
7. Añada 10 µl de **GynTect® Mastermix** a cada tubo de **GynTect® Strip**.

**Nota:** Se observa una coloración azul. Esto solo sirve como inspección óptica y no influye en el resultado de GynTect®.

**Importante:** Cambie las puntas de cada tubo de tiras, puesto que las **GynTect® Strips** ya contienen los cebadores para la PCR.

8. Añada **10 µl de muestra** en cada uno de los ocho pocillos de las **GynTect® Strips**.

**Importante:** Cambie las puntas de cada tubo de tiras.

**Nota:** Conserve el resto de los eluidos de muestra para repetir la PCR GynTect® si fuera necesario.

9. Cierre las **GynTect® Strips** directamente después del pipeteo con **GynTect® Caps** planos y transparentes.

**Atención:** Evite tocar el interior de los **GynTect® Caps** y las **GynTect® Strips**. Asegúrese de que las **GynTect® Strips** estén bien cerradas. La mejor forma de realizar la inspección visual es desde el lateral.

10. Agite en vórtex el **GynTect® Positive Control** durante 3 segundos a velocidad máxima y centrifúguelo.

11. Añada a cada uno de los ocho pocillos de la **GynTect® Strip** para control positivo **10 µl** de **GynTect® Positive Control** y a cada uno de los ocho pocillos de la **GynTect® Strip** para control negativo **10 µl** de **GynTect® Water**.

12. Cierre las **GynTect® Strips** directamente después del pipeteo con **GynTect® Caps** planos y transparentes.

**Atención:** Evite tocar el interior de los **GynTect® Caps** y las **GynTect® Strips**. Asegúrese de que las **GynTect® Strips** estén bien cerradas. La mejor forma de realizar la inspección visual es desde el lateral.

13. Etiquete todas las **GynTect® Strips** después de terminar el pipeteo y cerrar en los cierres de los nuevos **GynTect® Caps** (véase la Figura 7).

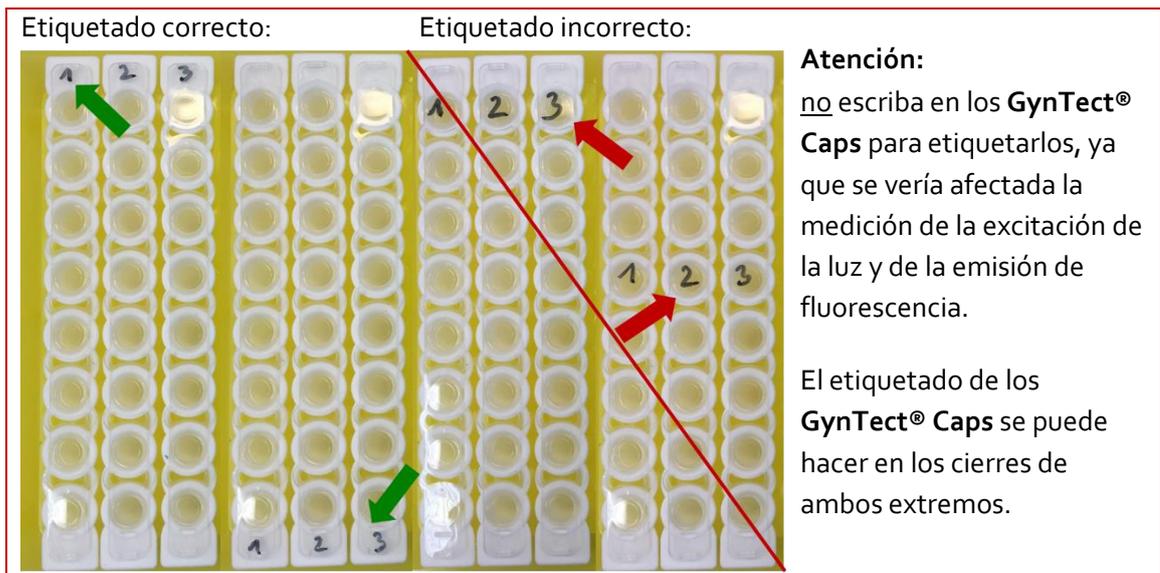


Figura 7 Etiquetado de las GynTect® Strips

14. Agite en vórtex todas las **GynTect® Strips** cerradas durante 3 segundos a velocidad máxima y centrifúguelas brevemente.

### 11.5.2. Realización de la PCR en el cobas z 480 Analyzer

En la siguiente sección se describe cómo realizar GynTect® en los sistemas de PCR en tiempo real del cobas z 480 Analyzer (marcado en azul) y el CFX96 Real-Time PCR Detection System (marcado en verde). No obstante, siga siempre las instrucciones del fabricante acerca del funcionamiento de los dispositivos de PCR.

La PCR se debe realizar en la sala 2.

#### 11.5.2.1. Creación de una plantilla de PCR

Si ha creado y guardado la plantilla de PCR anteriormente, puede continuar con 11.5.2.2 *Inicio de la ejecución de la PCR*.

1. Encienda el cobas z 480 Analyzer y su ordenador. En un plazo de 15 segundos, seleccione «Flujo de trabajo definido por el usuario» en la pantalla del ordenador en la BIOS para cambiar a un modo de dispositivo de libre programación.
2. Seleccione *New Experiment* para crear una nueva plantilla. En la pestaña *Run Protocol*, establezca el *Detection Format* en *SYBR Green 1 / HRM Dye (SYBR verde 1 / colorante HRM)* y fije el *Reaction Volume* en 20 µl. Programe el protocolo de temperatura según Tabla 8.

Tabla 8 Protocolo de temperatura de PCR en el cobas z 480 Analyzer

Program 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. Guarde la *Run-Template* (Plantilla de ejecución) con el nombre *GynTect*.

#### 11.5.2.2. Inicio de la ejecución de la PCR

Si ha guardado la plantilla de PCR anteriormente, ahora puede acceder a ella. Compruebe que está ajustado el protocolo de temperatura correcto.

1. En *Subset Editor*, genere la disposición de placa recomendada (véase la Figura 8 y la Figura 9).

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

Figura 8 Ejemplo de disposición de placa para seis muestras

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

Figura 9 Ejemplo de disposición de la placa para diez muestras utilizando GTO03-10

**Importante:** La disposición de placa **no** es variable. El control positivo (PC) se debe colocar en la fila 11 y el control negativo (NTC) en la fila 12.

- Defina en *Sample Editor* el etiquetado de las muestras.
- Coloque las tiras verticalmente en el dispositivo de PCR en el orden definido.

**Importante:** Utilice el adaptador para tiras de PCR (se puede solicitar a Roche Diagnostics GmbH).

- Guarde la ejecución de la PCR haciendo clic en el botón de disco en la ubicación deseada utilizando un nombre inequívoco e inicie la ejecución de la PCR haciendo clic en el botón *Start Run* en la pestaña *Run Protocol*.

### 11.5.2.3. Exportación de los datos

Si va a analizar la ejecución de PCR directamente en el ordenador del cobas z 480 Analyzer, continúe con 11.5.2.4 *Ajuste de evaluación en el software del aparato*.

Una vez finalizada la PCR (Ejecución completa), exporte la ejecución de PCR mediante  *Export* y guarde el archivo en la ubicación deseada.

#### 11.5.2.4. Ajuste de evaluación en el software del aparato

Si ha exportado la ejecución de PCR, inicie el software LightCycler® 480 en otro ordenador y abra/importe la ejecución de PCR. De lo contrario, realice el análisis en el ordenador del cobas z 480 Analyzer.

1. Elija el algoritmo *Abs Quant/Fit Points* en el editor *Analysis* y el posible subconjunto definido.
2. Fije el *Background* a entre 5 y 20 en la pestaña *Cycle Range* y además elija *Min Offset 4* y *Max Offset 19*. Asegúrese del ajuste del primer ciclo y el último ciclo: el rango de ciclo debe incluir de 1 a 42.
3. Asegúrese en la pestaña *Noise Band* de que el *STD Multiplier* está ajustado a 12 y la banda de ruido se calcula automáticamente.
4. Ajuste la pestaña *Analysis Threshold* a 0,5 y compruebe que el número de *Fit Points* está ajustado a 2.
5. A continuación confirme todos los ajustes pulsando el botón *Calculate* y realice el análisis. Exporte la tabla de datos mediante *Export Table* haciendo clic con el botón derecho del ratón en *As .txt-file* y guárdela en la ubicación deseada utilizando un nombre inequívoco.
6. Vuelva al editor *Analysis* y elija el algoritmo *Tm Calling* en *Analysis* y el posible subconjunto definido.
7. Seleccione también la casilla de verificación *Height* junto a *Tm* y confirme todos los ajustes haciendo clic en el botón *Calculate* y realice el análisis. Exporte la tabla de datos mediante *Export Table* haciendo clic con el botón derecho del ratón en *As .txt-file* y guárdela en la ubicación deseada utilizando un nombre inequívoco.

En el capítulo 11.6 se describe el análisis y la interpretación de los datos de la PCR.

### 11.5.3. Realización de la PCR en el CFX96 Real-Time PCR Detection System

Siga siempre las instrucciones del fabricante acerca del funcionamiento de los dispositivos de PCR.

La PCR se debe realizar en la sala 2.

#### 11.5.3.1. Creación de una plantilla de PCR

1. Encienda el dispositivo de PCR.
2. Programe el protocolo de temperatura de la PCR como se describe a continuación en la Tabla 9 seleccionando y editando los pasos de temperatura y los tiempos de edición.

Tabla 9 Protocolo de temperatura PCR\*\* en el 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		94 °C	0:15
	3*	42 X	66 °C	0:35
	4		GO TO Step 2	41 X
	5	1 X	95 °C	0:15
Melt Curve	6*	1 X	65 °C	0:05
			95 °C	0.5 °C/cycle
Cooling	5	1 X	37 °C	1:00

\* La señal de fluorescencia se detecta mediante "Plate Read" durante los pasos 3 y 6, lo que se simboliza con el símbolo de la cámara.

\*\* En el CFX96 Real-Time PCR Detection System, la velocidad de rampa por defecto es de 5 °C/seg. Este ajuste se utilizó para validar esta prueba DIV.

3. Fije el *Volume* en 20 µl y el calentador de la *Lid* en 105 °C.
4. Guarde la plantilla de PCR con el nombre *GynTect*.

#### 11.5.3.2. Inicio de la ejecución de la PCR

Si ha guardado la plantilla de PCR anteriormente, ahora puede acceder a ella. Compruebe que está ajustado el protocolo de temperatura correcto.

1. Coloque las GynTect® Strips en el dispositivo de PCR introduciéndolas verticalmente en los pequeños pocillos del bloque calefactor. Seleccione una disposición de placa adecuada (véase la Figura 10 y la Figura 11).

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

Figura 10 Ejemplo de disposición de placa para seis muestras de pacientes

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

Figura 11 Ejemplo de disposición de placa para diez muestras de pacientes utilizando GT003-10

**Importante:** la disposición de placa no es variable. El control positivo (PC) se debe colocar en la fila 11 y el control negativo (NTC) en la fila 12.

2. Pulse el botón *Run* y designe la ejecución en *File Name* utilizando un nombre de archivo adecuado. Seleccione *SYBR/FAM* y pulse *OK* para iniciar la ejecución.

#### 11.5.3.3. Exportación de los datos

Tras completar la PCR, exporte la ejecución de PCR (archivo .pcrd).

#### 11.5.3.4. Ajustes de evaluación en el software del dispositivo

1. Abra el software Bio-Rad CFX y establezca primero *Plate Type: BR White* en *User* → *User Preferences* → *Plate* para indicar que se utiliza plástico blanco.
2. Importe el archivo .pcrd.
3. Defina la disposición de placa en *Plate Setup* → *View/Edit Plate*. Introduzca el nombre en *Sample Names*. Las posiciones sin ocupar se marcan y pueden excluirse del análisis marcando *Exclude Wells in Analysis*. Confirme la disposición de la placa en *OK*.
4. Establezca los ajustes del análisis en *Settings* (véase la Tabla 10).

Tabla 10 Ajustes de análisis en el CFX96 Real-Time PCR Detection System

Parámetro	Ajuste
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. Seleccione *Load a Preset View* → *Amplification + Melt* en la pestaña *Custom Data View*. Ajuste manualmente el umbral en *Melt Peak Chart* a cero arrastrando y soltando.
6. Seleccione *Custom Export* en la pestaña *Export* y realice los siguientes ajustes:
  - Formato: Excel 2007 (\*.xlsx)
  - Datos a exportar → marque las casillas siguientes  
(*Include Run Information Header, Well, Fluorophore, Target Name, Content, Sample Name, Cq, Melt Temperature, Melt Peak Height*)

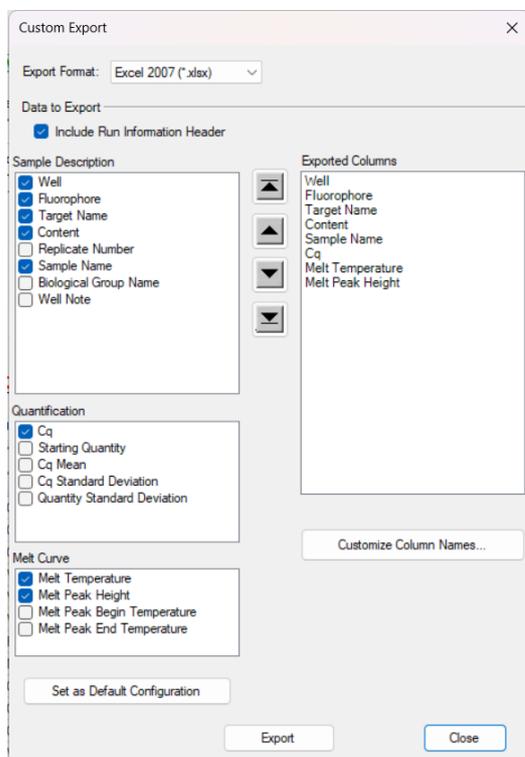


Figura 12 Exportación personalizada

7. Pulse el botón *Export* y guarde el archivo .xlsx con un nombre claro.

## 11.6. Evaluación e interpretación de los datos de PCR

A continuación se describe el análisis de los datos exportados.

1. Abra un programa de hoja de cálculo adecuado y copie en él los datos de PCR exportados.
2. Formatee los datos de manera que, por ejemplo, los resultados de cada muestra se escriban en una columna y que todas las muestras se escriban una al lado de la otra.

Marcador	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Muestra 6		PC		NTC	
	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		

### Verificación de la validez de la ejecución de la PCR

3. La ejecución de la PCR es **válida** si los controles positivo y negativo cumplen los siguientes criterios (véase la Tabla 11).

Tabla 11 Criterios de validez de los controles GynTect®

Marcador	Valor Ct	Control positivo		Control negativo
		Rango de temperatura de fusión (cobas)	Rango de temperatura de fusión (CFX)	
ASTN1	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 86 °C	78 °C - 86 °C	Sin valor*
DLX1	≥ 20, ≤ 38	79 °C - 85 °C	77 °C - 85 °C	Sin valor*
ITGA4	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	Sin valor*
RXFP3	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	Sin valor*
SOX17	≥ 20, ≤ 38	81 °C - 87 °C	79 °C - 87 °C	Sin valor*
ZNF671	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 87 °C	78 °C - 87 °C	Sin valor*
ACHE	≥ 20, ≤ 38	78 °C - 83 °C	76 °C - 83 °C	Sin valor*
IDS-M	≥ 20, ≤ 38	78 °C - 88 °C	76 °C - 88 °C	Sin valor*

\* **Precaución:** no se debe recibir ningún valor Ct para el control negativo. Si se obtiene un valor Ct para alguno de los marcadores, no debe mostrar una curva de fusión específica de marcador.

### Comprobación de la validez y la positividad de las muestras

4. El resultado para la muestra de la paciente es **válido** si los marcadores de control ACHE e IDS M cumplen los siguientes criterios (véase la Tabla 12).

Tabla 12 Criterios de validez de los marcadores de control para muestras de pacientes

Marcador	Valor Ct	Rango de temperatura de fusión (cobas)	Rango de temperatura de fusión (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

- El resultado GynTect® para esta muestra se considera **inválido**, si se genera un valor Ct > 0, < 20 con una temperatura de fusión en el rango definido.
- Para las muestras **válidas**, utilice la siguiente ecuación para calcular el valor  $\Delta Ct$  de todos los marcadores específicos de metilación detectados con valores Ct y temperaturas de fusión en el rango definido (véase la Tabla 13):

Evaluación de $\Delta Ct$
$\Delta Ct = Ct_{(\text{Marcador } x)} - Ct_{(\text{IDS-M})}$

Para cada muestra, los marcadores específicos de metilación se califican como **positivos** si los valores  $\Delta Ct$  generan los valores según la Tabla 13.

Tabla 13 Criterios de positividad para marcadores específicos de metilación para muestras de pacientes

Marcador	Valor Ct	Rango de temperatura de fusión (cobas)	Rango de temperatura de fusión (CFX)	Valor $\Delta Ct$
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	$\leq 10,00$

**Importante:** Analice las curvas de amplificación y fusión en relación con los puntos de datos controvertidos y las características de la curva. Las muestras con características de curva controvertidas se deben puntuar como inválidas .

### Evaluación del ensayo GynTect®

- Para evaluar un ensayo GynTect®, atribuya los siguientes valores a los marcadores positivos individuales y sume los valores de los seis marcadores:

Tabla 14. Valores para los marcadores GynTect®

Marcador	Valor si el marcador es positivo	Valor si el marcador es negativo
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Si la **suma** de los valores de todos los marcadores **es igual o superior a 6**, el ensayo GynTect® de la muestra es **positivo**.

Si la **suma** de todos los valores del marcador **es igual o inferior a 5**, el ensayo GynTect® de la muestra es **negativo**.

Un resultado positivo de la prueba GynTect® se correlaciona con la presencia de una neoplasia intraepitelial cervical o un carcinoma cervical. El resultado de GynTect® no se debe utilizar para tomar una decisión terapéutica definitiva, sino que se debe evaluar en combinación con otros hallazgos clínicos.

## 12. RENDIMIENTO DE GYNTECT®

Los datos de rendimiento que se muestran aquí se tomaron en el cobas z 480 Analyzer.

### 12.1. Rendimiento analítico

#### 12.1.1. Sensibilidad analítica: detección de ADN metilado

La sensibilidad analítica del ensayo PCR se determinó utilizando ADN genómico humano metilado y convertido por bisulfito. Los límites de detección correspondientes se resumen en la Tabla 15. Las series de dilución se probaron en tres experimentos independientes, cada una por triplicado. Utilizando raspados normales, se emplean para el ensayo de 20 a 50 ng.

Tabla 15 Sensibilidad analítica del ensayo de PCR: parte 1

Cantidad de ADN utilizada	Número de células en el ensayo *	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0,2 ng	30 células	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
0,1 ng	15 células	9/9	9/9	9/9	8/8	8/8	9/9
0,05 ng	7,5 células	9/9	9/9	9/9	9/9	5/9	9/9
0,02 ng	3 células	7/9	8/9	6/9	9/9	6/9	8/9
0,01 ng	1,5 células	5/9	5/9	6/9	8/9	5/9	6/9
0,005 ng	< 1 célula	8/9	7/9	4/9	6/9	1/9	6/9
0,002 ng	< 1 célula	3/9	3/9	1/9	2/9	0/9	1/9

\* Una célula contiene aprox. 6-7 pg de ADN genómico

El límite de detección global en el que los marcadores de metilación son detectables en todas las reacciones se sitúa en 15 células (0,1 ng).

Además, en experimentos similares se ensayó una mezcla de ADN compuesta por ADN genómico humano metilado convertido por bisulfito y ADN genómico humano no metilado convertido por bisulfito. En cada ensayo se utilizaron 20 ng o 100 ng de ADN, respectivamente. Las series de dilución se probaron en tres experimentos independientes, cada una por triplicado (véase la Tabla 16).

Tabla 16 Sensibilidad analítica del ensayo de PCR: parte 2

Porcentaje de ADN metilado	Cantidad total de ADN	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

\* Una de cada nueve muestras fue negativa para el marcador ACHE y se debe excluir.

El límite de detección para los marcadores de metilación se determinó en un 1 % de ADN metilado para una muestra de 20 ng y en un 10 % para una muestra con 100 ng de ADN por ensayo.

Los resultados de un experimento *spike-in* de células SiHa en muestras de pacientes revelan que en caso de una concentración de al menos  $3 \times 10^5$  células por ml se puede detectar de forma fiable una fracción del 0,1 % de células metiladas.

### 12.1.2. Especificidad analítica: detección de ADN no metilado

La especificidad analítica del ensayo de PCR se determinó utilizando fragmentos de PCR convertidos por bisulfito no metilados de 10-12 kb de longitud que representaban el genoma humano completo. Los experimentos se realizaron en una determinación quintuple y los resultados se resumen en la Tabla 17. La validez de las muestras se aseguró mediante el marcador ACHE. No se obtuvo ningún resultado positivo en la prueba GynTect® hasta una concentración de 750 ng de ADN convertido por bisulfito no metilado (biADN).

Tabla 17 Especificidad analítica del ensayo de PCR

ADN utilizado	ASTN1 Cp $\leq 42$	DLX1 Cp $\leq 42$	ITGA4 Cp $\leq 42$	RXFP3 Cp $\leq 42$	SOX17 Cp $\leq 42$	ZNF671 Cp $\leq 42$
0 ng de biADN no metilado	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
100 ng de biADN no metilado	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5
250 ng de biADN no metilado	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
500 ng de biADN no metilado	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
750 ng de biADN no metilado	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
75 ng de gADN metilado	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

## 12.2. Precisión

### 12.2.1. Repetibilidad

Se analizaron con GynTect® 20 muestras diferentes tres veces. En cada caso se realizó una nueva preparación y un nuevo tratamiento de las muestras con bisulfito. Los tres experimentos corrieron a cargo de una misma persona que los realizó en días diferentes. 16 muestras arrojaron resultados idénticos en 3/3 ejecuciones. Por tanto, el 80 % de las muestras pueden tener una repetibilidad del 100 % en tres experimentos.

### 12.2.2. Reproducibilidad

Se analizaron con GynTect® 20 muestras diferentes tres veces en laboratorios independientes. En cada caso se realizó una nueva preparación y un nuevo tratamiento de las muestras con bisulfito y se utilizaron diferentes dispositivos de PCR (cobas z 480 Analyzer o LightCycler II 480). La comparación de dos resultados de cada muestra genera tres valoraciones por muestra (laboratorio a frente a laboratorio b, laboratorio b frente a laboratorio c, laboratorio a frente a laboratorio c). Con los datos obtenidos de esta forma, el 90 % de las valoraciones resultaron idénticas. La evaluación de la comparación válida da como resultado un 96,43 % de reproducibilidad.

## 12.3. Robustez

Se probaron las siguientes variaciones en el perfil de temperatura de la ejecución de la PCR sin que se observaran desviaciones en el resultado final de GynTect® (realizado con cuatro muestras diferentes y un control sin plantilla):

Tabla 18 Variaciones del perfil de temperatura

Desviación del protocolo original	Efectos sobre la positividad GynTect® PC	Desviación media del valor Cp Todos los marcadores
65 °C temperatura de recocido	Ninguno	< 1
67 °C temperatura de recocido	Ninguno	< 1
92 °C temperatura de desnaturalización	Ninguno	< 1
96 °C temperatura de desnaturalización	Ninguno	< 1
96 °C temperatura de desnaturalización y 10 seg. desnaturalización y 30 seg. recocido/elongación	Ninguno	Hasta 1,12 o superior
96 °C temperatura de desnaturalización y 20 seg. desnaturalización y 40 seg. recocido/elongación	Ninguno	< 1

La colocación de la muestra en el dispositivo de PCR no influye en el resultado de GynTect®.

#### 12.4. Rendimiento clínico

Las muestras de pacientes utilizadas se obtuvieron de hospitales europeos (Alemania, Portugal, Eslovaquia).

El tratamiento con bisulfito de las muestras de las pacientes se realizó como se describe en el capítulo 11.4.

Para la determinación del rendimiento clínico de GynTect® se investigaron 321 muestras de pacientes con las siguientes características: Papanicolaou I (n = 199; 62 %), CIN 1 (n = 20; 6,2 %), CIN 2 (n = 28; 8,7 %), CIN 3 (n = 64; 19,9 %), carcinoma cervicouterino (n = 10; 3,1 %).

A partir del punto de corte establecido se calculó la sensibilidad y la especificidad clínicas.

Tabla 19 Rendimiento clínico de GynTect®

Resultado	Detección de GynTect®	CI 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 %

CI = intervalo de confianza

Tabla 20 Sensibilidad y especificidad

Sensibilidad para CIN 3+	Especificidad para CIN 3+	Tasa de falsos positivos para Papanicolaou I
67,6 %	89,9 %	4,0 %

### **13. LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO**

- La interpretación de los resultados de GynTect® se debe realizar siempre en conjunción con los resultados de otros procedimientos diagnósticos de laboratorio y teniendo en cuenta también el cuadro clínico.
- Para evitar resultados erróneos, hay que respetar las especificaciones según las instrucciones de uso, por ejemplo los volúmenes de pipeteo, los tiempos de incubación, las temperaturas y los pasos de preparación.
- La toma de muestras y el almacenamiento adecuados son aspectos fundamentales para los resultados de las pruebas.
- En principio, en los procedimientos de las pruebas biológicas moleculares no se puede descartar que otras variantes de secuencia muy poco frecuentes puedan influir en el resultado de la prueba y que aún no estén contempladas en las fuentes consultadas para el análisis de la especificidad y la sensibilidad de los cebadores y las sondas.
- El funcionamiento de los instrumentos fuera de las especificaciones, así como las desviaciones del procedimiento de prueba descrito, las condiciones de almacenamiento especificadas, los materiales, el equipo o el material de muestra recomendado, puede dar lugar a diferencias con respecto a los resultados que se obtienen al cumplir todas las especificaciones.
- Los controles internos y externos proporcionados sirven como ayuda para la detección de fallos. Sin embargo, no son capaces de detectar todos los fallos posibles. Es responsabilidad del usuario validar cualquier modificación realizada o, si procede, los dispositivos utilizados y garantizar el cumplimiento de las especificaciones del dispositivo.

### **14. REFERENCIAS**

- [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.* Volumen 9, número 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] Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (2008). Directrices europeas para la garantía de calidad en el cribado del cáncer de cuello uterino (segunda edición)

## 15. RESPONSABILIDAD

El kit GynTect® solo se puede utilizar de acuerdo con su finalidad prevista. Oncnostics GmbH no asume ninguna responsabilidad por cualquier otro uso (por ejemplo, en caso de incumplimiento de estas instrucciones o de un uso inadecuado) y cualquier daño resultante.

## 16. PREGUNTAS Y PROBLEMAS

En caso de preguntas y problemas con el producto, póngase en contacto con su interlocutor de oncnostics GmbH.

Puede contactar con el servicio técnico de oncnostics GmbH de lunes a viernes entre las 8:00 y las 16:00 h llamando al siguiente número: **+49 (0) 3641 5548500**.

Al margen de este horario de contacto, puede contactar con nosotros por correo electrónico: **gyntect@oncnostics.com**.

### oncnostics GmbH

Löbstedter Straße 41

07749 Jena (Alemania)

Dirección: Dr. Alfred Hansel, Dra. Martina Schmitz

En caso de que se produzca alguno de los siguientes errores durante el procesamiento de las muestras cervicales, la realización de la PCR y el análisis de los datos o bien en caso de fallo del ensayo GynTect® en su conjunto debido a uno de los controles, proceda tal como se describe a continuación.

Tabla 21. Solución de problemas

Problema y causa	Observaciones y sugerencias
<b>CENTRIFUGADORA</b> No se dispone de centrifugadora para las placas/tiras de PCR	Agite enérgicamente la tira de ocho pocillos desde la muñeca hasta que todo el líquido esté en el fondo de los pocillos. El interior de la tapa debe estar libre de gotas; repita el proceso si es necesario.
<b>TEMPERATURAS DE FUSIÓN INVÁLIDAS</b> La GynTect® Strip se colocó en el sistema de PCR girada 180°  Las curvas de amplificación y fusión están visibles, pero las temperaturas de fusión se desvían sustancialmente de los requisitos indicados en el manual	La temperatura de fusión en la posición B se debe corresponder con la temperatura de fusión de la posición G. Los pocillos A y B muestran amplificación para todas las GynTect® Strips excepto para el control negativo. Las muestras se pueden analizar.  Póngase en contacto con oncnostics GmbH.

## RESULTADO DE PCR NULO/INVÁLIDO

Valor Cp del marcador IDS-M por encima del valor objetivo

Repita la prueba para la muestra utilizando un nuevo ensayo GynTect®.

Repita la prueba para la muestra utilizando un nuevo ensayo GynTect® opcionalmente con un volumen de muestra mayor (de 2 ml a 3 ml). En caso de un nuevo resultado negativo para los marcadores, la muestra de la paciente no se puede analizar.

Superación del valor objetivo para GynTect® Positive Control y/o GynTect® Negative Control

Repetir GynTect® para todas las muestras con eluidos de muestra llenos (ad 80 µl GynTect® Water).

## 17. NOTAS ADICIONALES

Aviso reglamentario para los clientes de la Unión Europea: tenga en cuenta su obligación de informar a su autoridad competente y a oncgistics GmbH sobre cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto.

La versión actual de la ficha de datos de seguridad de este producto se encuentra en el centro de descargas de la página web (<http://www.oncgistics.com/en/downloadcenter/>) o se puede solicitar por correo electrónico a [gyntect@oncgistics.com](mailto:gyntect@oncgistics.com).

## 18. SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
	Mastermix		Limitación de temperatura
	Tiras de PCR		Caducidad
	Tapones		Suficiente para <n> pruebas
	Control positivo		Fabricante
	Agua		Consulte las instrucciones de uso
	Diagnóstico <i>in vitro</i>		Almacenar protegido de la luz
	Código de lote		No reutilizar
	Número de catálogo		Marcado CE

## 19. LISTA DE CAMBIOS

Versión anterior (Fecha de publicación)	Cambios
3.5 (mayo de 2022)	<ul style="list-style-type: none"><li>– Reestructuración; los capítulos se han desplazado dentro de las instrucciones de uso</li><li>– Capítulo 11.2 Muestreo<ul style="list-style-type: none"><li>○ Se han adaptado las condiciones de almacenamiento de las muestras cervicales</li></ul></li><li>– Capítulo 11.5.2 Realización de la PCR en el cobas z 480 Analyzer<ul style="list-style-type: none"><li>○ Posición fija de PC (fila 11) y NTC (fila 12)</li><li>○ Capturas de pantalla eliminadas</li></ul></li><li>– Adición del capítulo 11.5.3 Realización de la PCR en el CFX96 Real-Time PCR Detection System</li><li>– Se han añadido los siguientes capítulos:<ul style="list-style-type: none"><li>○ Capítulo 5 Material de referencia</li><li>○ Capítulo 13 Límites del procedimiento</li><li>○ Capítulo 14 Referencias</li><li>○ Capítulo 15 Responsabilidad</li><li>○ Capítulo 17 Notas adicionales</li><li>○ Capítulo 19 Lista de cambios</li></ul></li></ul>

## 20. PROTOCOLO BREVE

A continuación encontrará una plantilla proforma de un protocolo breve a modo de lista de comprobación.

Antes de utilizar este protocolo breve, le rogamos que lea las instrucciones completas con todas las notas y consejos en el capítulo 11.

El kit de bisulfito no forma parte del kit GynTect®. El tratamiento de las muestras con bisulfito se debe realizar utilizando el kit de bisulfito rápido EpiTect® (10).

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Agite en vórtex la muestra de la paciente durante cinco segundos a velocidad máxima y transfiera 1 ml de medio a un tubo de 1,5 ml
- Centrifugue la muestra durante 5 minutos a 10 000 xg
- Retire 900 µl de sobrenadante por encima del precipitado y deséchelo

## TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CON BISULFITO

- Prepare los Buffers del EpiTect® Fast Bisulfite Kit según la tabla a

Tabla a Composición de Buffers del EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Buffer	Añada etanol
Buffer BL*	-
Buffer BW	30 ml de etanol (96-100 %)
Buffer BD	27 ml de etanol (96-100 %)

\* No añadir Carrier ARN, control de calidad

- Prepare la reacción según la Tabla b en un tubo de 0,5 ml, agite en vórtex y centrifugue

Tabla b Reacción de bisulfito

Compuesto	Por reacción
Bisulfite Solution*	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Muestra resuspendida	40 µl
Volumen total/reacción	140 µl

\* Control de calidad

- Conversión utilizando un termociclador, compruebe el perfil de temperatura según la Tabla 7
- Agite las muestras en vórtex y centrifugue brevemente
- Añada **310 µl de Buffer BL** a la MinElute® Spin Column
- Añada la muestra y pipetee cinco veces arriba y abajo
- Añada **250 µl de etanol** (96-100 %) y mezcle cinco veces poniendo el pivote de la columna boca arriba
- Centrifugue la columna durante 30 segundos a 18 000 xg y deseche el flujo
- Añada **200 µl de Buffer BW** y centrifugue la columna durante 30 segundos a 18 000 xg
- Añada **200 µl de Buffer BD** e incube a temperatura ambiente durante 15 minutos
- Centrifugue la columna durante 30 segundos a 18 000 xg
- Añada **200 µl de Buffer BW**, centrifugue la columna durante 30 segundos a 18 000 xg y deseche el flujo
- Añada **400 µl de Buffer BW** y centrifugue la columna durante 30 segundos a 18 000 xg
- Añada **200 µl de etanol** (96-100 %) y centrifugue la columna durante 30 segundos a 18 000 xg

- Coloque la columna en un nuevo Collection Tube de 2 ml y centrifugue la columna durante 60 segundos a 18 000 ×g
- Coloque la columna en un tubo de 1,5 ml, añada **20 µl de agua** e incube durante 60 segundos a temperatura ambiente
- Centrifugue la columna durante 60 segundos a 8000 ×g
- Punto de interrupción opcional:* el flujo de trabajo se puede interrumpir aquí y las muestras se pueden almacenar

### PREPARACIÓN Y PIPETEO DE LA PCR

- Añada **70 µl de GynTect® Water** a cada muestra, agite en vórtex y centrifugue brevemente
- Agite en vórtex y centrifugue brevemente **GynTect® Mastermix**
- Retire los tapones de color de las **GynTect® Strips** que vaya a utilizar
- Añada **10 µl de GynTect® Mastermix** a cada pocillo de reacción
- Añada **10 µl de muestra** o **GynTect® Positive Control** o **GynTect® Water** a cada uno de los ocho pocillos de la **GynTect® Strip** correspondiente
- Cierre las **GynTect® Strips** con **GynTect® Caps**
- Agite en vórtex y centrifugue brevemente las **GynTect® Strips**

### REALIZACIÓN DE LA PCR

- Inicie el dispositivo de PCR, abra el software y elija la plantilla (GynTect)
- Designe la ejecución de la PCR de forma individual, prepare la disposición de placa y compruebe el perfil de temperatura
- Almacenamiento de la ejecución de PCR
- Coloque las **GynTect® Strips** en el dispositivo e inicie la ejecución de la PCR
- Tras finalizar la PCR, realice los ajustes de evaluación y exporte el archivo .txt o .xlsx

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PCR

- Abra los archivos exportados (.txt o .xlsx) en el programa de hoja de cálculo que desee
- Compruebe los resultados del **control positivo** y del **control negativo** para todos los marcadores
- Compruebe la validez y la positividad de todas las muestras según la Tabla c

Tabla c Criterios de validez y positividad

Marcador	Valor Ct	Rango de temperatura de fusión (cobas)	Rango de temperatura de fusión (CFX)	$\Delta Ct$ (Marcador x - IDS-M)	Criterios para
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 86 °C	78 °C - 86 °C	$\leq 8,00$	Positividad
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	$\leq 10,00$	Validez
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	-	

- Evalúe los **resultados de GynTect®**

Tabla d Valores para los marcadores GynTect®

Marcador	Valor si el marcador es positivo	Valor si el marcador es negativo
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Suma de todos los valores  $\geq 6$   
**→ GynTect® positivo**

Un resultado positivo de la prueba GynTect® se correlaciona con la presencia de una neoplasia intraepitelial cervical o un carcinoma cervical. El resultado de GynTect® no se debe utilizar para tomar una decisión terapéutica definitiva, sino que se debe evaluar en combinación con otros hallazgos clínicos.