



# GynTect®

IUD-ID de base: 426076785GYNTECTYM

## Notice d'utilisation

**REF**



**IUD-ID**

GT003-06

6 échantillons

4260767851017

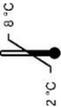
GT003-10

10 échantillons

4260767851116



Lire attentivement les présentes instructions avant de procéder au test GynTect®. Respecter point par point les présentes instructions afin de garantir la fiabilité des résultats du test.



GynTect® est un kit de diagnostic *in vitro* pour la détection qualitative de six marqueurs épigénétiques dans l'ADN converti au bisulfite à partir d'échantillons cervicaux de femmes ayant un résultat positif au test HPV ou un résultat incertain au test Pap. Un résultat positif au test GynTect® correspond à la présence d'une néoplasie cervicale intraépithéliale ou d'un carcinome cervical.

Produit réservé au diagnostic *in vitro* effectué par un personnel qualifié.

Révision 6 (septembre 2024)

Traduction publiée en octobre 2024



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





## EXPÉDITION ET STOCKAGE

Le kit GynTect® est livré à température ambiante. La température limite est surveillée par un point de mesure de la température. Contrôler le point de mesure dès l'arrivée du kit en observant les changements de couleur (voir Figure 1), et vérifier que l'emballage secondaire, le scellage et l'emballage principal ne sont pas endommagés. À sa réception, le kit doit être immédiatement refroidi entre 2 °C et 8 °C et conservé à l'abri de la lumière. Une expédition et un stockage adaptés permettent d'utiliser le kit GynTect® ainsi que tous ses composants jusqu'à la date de péremption indiquée. Dans ces conditions de conservation, la date de péremption concerne les réactifs GynTect® ouverts.



Figure 1 Surveillance de la température de transport

Le point de mesure de la température du kit GynTect® permet de surveiller la température pendant le transport. Le carré argenté brillant au centre du point indique que la température pendant le transport n'a pas dépassé la température de transport autorisée. À l'inverse, un carré noir indique que la température autorisée a été dépassée pendant le transport. Les caractéristiques de performance du kit GynTect® ne peuvent plus être garanties. Dans ce cas, contacter oncgnostics GmbH.

## TABLE DES MATIERES

1.	Destination .....	5
2.	Importance clinique .....	5
3.	Principe de la méthode d'essai .....	5
4.	Conception du test GynTect® .....	7
4.1.	Disposition des bandelettes GynTect® Strips.....	7
4.2.	Contrôles .....	7
4.2.1.	Contrôle de qualité du traitement au bisulfite (ACHE).....	7
4.2.2.	Contrôle de qualité de la méthylation (IDS-M) .....	8
4.2.3.	Contrôle positif .....	8
4.2.4.	Contrôle négatif .....	8
5.	Matériaux de référence .....	8
6.	Contenu du kit.....	8
7.	Consommables et équipement (non fournis avec le kit) .....	9
8.	Stockage et durée de conservation .....	10
9.	Consignes de sécurité.....	10
9.1.	Généralités.....	10
9.2.	Répartition spatiale .....	11
9.3.	Éviter la contamination .....	12
9.4.	Instructions de manipulation.....	12
10.	Mise au rebut .....	12
11.	Procédure GynTect® .....	13
11.1.	Chronologie du flux de tâches .....	13
11.2.	Échantillonnage .....	13

11.3.	Préparation de l'échantillon .....	14
11.4.	Traitement au bisulfite des échantillons.....	14
11.4.1.	Conversion au bisulfite de l'ADN .....	14
11.4.2.	Purification de l'ADN converti .....	16
11.5.	PCR.....	17
11.5.1.	Préparation et pipetage de la PCR.....	17
11.5.2.	Réalisation de la PCR sur le cobas z 480 Analyzer.....	19
11.5.3.	Réalisation de la PCR sur le CFX96 Real-Time PCR Detection System.....	22
11.6.	Évaluation et interprétation des données PCR .....	25
12.	Performance de GynTect® .....	28
12.1.	Performance analytique .....	28
12.1.1.	Sensibilité analytique - détection de l'ADN méthylé .....	28
12.1.2.	Spécificité analytique – détection de l'ADN non méthylé .....	29
12.2.	Précision .....	30
12.2.1.	Répétabilité .....	30
12.2.2.	Reproductibilité .....	30
12.3.	Robustesse.....	30
12.4.	Performance clinique .....	31
13.	Limites de la méthode.....	32
14.	Références .....	32
15.	Responsabilité.....	33
16.	Questions et problèmes .....	33
17.	Remarques complémentaires .....	34
18.	Signification des symboles.....	34
19.	Liste des modifications .....	35
20.	Protocole succinct.....	35

## **1. DESTINATION**

GynTect® est un kit de diagnostic *in vitro* pour la détection qualitative de six marqueurs épigénétiques dans l'ADN converti au bisulfite à partir d'échantillons cervicaux de femmes ayant un résultat positif au test HPV ou un résultat incertain au test Pap. Un résultat positif au test GynTect® correspond à la présence d'une néoplasie cervicale intraépithéliale ou d'un carcinome cervical.

GynTect® est uniquement prévu pour être utilisé par un personnel qualifié et familiarisé avec les techniques biologiques moléculaires.

## **2. IMPORTANCE CLINIQUE**

Le cancer du col de l'utérus est le 4<sup>e</sup> cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde, avec plus de 600 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année [1]. Dans presque tous les cas de cancer du col de l'utérus, on observe une infection persistante par un papillomavirus humain (HPV) à haut risque [2], ce qui prouve que l'infection par le HPV est une condition préalable à la carcinogenèse du col de l'utérus. Les femmes dont le résultat au test HPV est négatif n'ont qu'un risque extrêmement faible de développer un cancer du col de l'utérus. Cependant, la plupart des femmes testées positives au HPV ne développent pas de lésion précancéreuse ou de cancer. Environ 15 % des femmes infectées par le HPV seulement risquent de développer une telle lésion précancéreuse du col de l'utérus [3].

Les patientes dont le résultat du test HPV est positif ou dont les résultats du test Pap ne sont pas clairs (Pap II, Pap III et Pap III D1 et D2) peuvent se voir recommander un test de triage tel que GynTect®, qui permet d'estimer la probabilité de la prévalence d'une maladie cancéreuse du col de l'utérus susceptible de nécessiter un traitement.

Le résultat du test GynTect® ne doit pas être utilisé pour prendre une décision thérapeutique finale. Il doit être évalué en combinaison avec d'autres résultats cliniques.

## **3. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI**

Le test GynTect® est basé sur la détection de biomarqueurs épigénétiques, plus précisément des méthylations de régions spécifiques de l'ADN, qui sont en corrélation avec l'existence de lésions précancéreuses ou de carcinomes du col de l'utérus [4, 5, 6]. En outre, un marqueur de référence spécifique au bisulfite ainsi qu'un marqueur de référence spécifique à la méthylation sont analysés. Les régions des marqueurs qui s'appliquent à GynTect® sont répertoriées dans Tableau 1.

Tableau 1 Vue d'ensemble des régions des marqueurs de GynTect®

Désignation du protocole	Région du marqueur (nom du gène)
Marqueur de méthylation	ASTN <sub>1</sub>
	DLX <sub>1</sub>
	ITGA <sub>4</sub>
	RXFP <sub>3</sub>
	SOX <sub>17</sub>
	ZNF6 <sub>71</sub>
Marqueur de contrôle	ACHE
	IDS-M

Les marqueurs sont détectés par PCR en temps réel très sensible. La sortie des instruments en temps réel est la valeur Cp (point de croisement, cobas z 480 Analyzer) ou la valeur Cq (quantification du cycle, CFX96 Real-Time PCR Detection System), qui correspondent toutes deux à la valeur Ct du seuil du cycle et sont également désignées comme telles ci-dessous. Cette valeur correspond au cycle d'une PCR en temps réel au cours duquel la fluorescence dépasse pour la première fois une valeur seuil définie.

L'analyse d'un échantillon prélevé avec GynTect® sur une patiente se déroule en deux étapes.

Tout d'abord, l'ADN du frottis du col utérin est traité par une réaction au bisulfite, qui entraîne une « fixation » de la méthylation de l'ADN. Pour la purification suivant la conversion au bisulfite, nous recommandons un protocole plus court et simplifié. Après élution, l'ADN est dilué avec de l'eau. La deuxième étape consiste à analyser l'ADN converti au bisulfite par huit réactions PCR en temps réel spécifiques à la méthylation. Les régions d'ADN initialement méthylées sont amplifiées de manière sélective à l'aide d'amorces placées dans les éprouvettes d'une bande PCR à huit éprouvettes.

La détection en temps réel du marqueur de méthylation et des régions de contrôle est réalisée à l'aide d'un colorant fluorescent intercalant. En outre, un contrôle positif et un contrôle négatif sont utilisés pour contrôler la PCR. L'analyse spécifique au test est ensuite effectuée.

L'échantillonnage et le kit de bisulfite ne font pas partie du kit GynTect®. Des produits spéciaux réservés à l'échantillonnage et le traitement au bisulfite sont disponibles séparément.

Le principe du test est présenté dans la Figure 2.

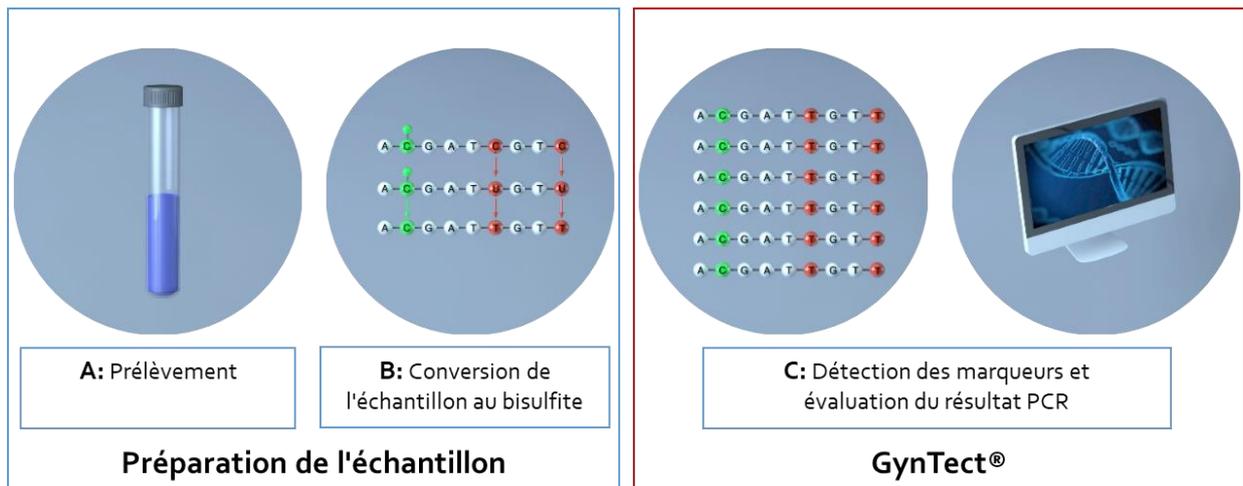


Figure 2 Principe du test

**A :** le gynécologue effectue un frottis du col utérin de la patiente, qui est transféré dans un fluide d'échantillonnage.

**B :** le laboratoire de diagnostic effectue la conversion au bisulfite de l'échantillon de la patiente.

**C :** huit réactions PCR singleplex sont réalisées pour chaque échantillon. L'évaluation est réalisée en détectant le colorant fluorescent intercalant contenu dans le mélange maître et des pics définis de la courbe de fusion.

## 4. CONCEPTION DU TEST GYNTECT®

### 4.1. Disposition des bandelettes GynTect® Strips

Chaque GynTect® Strip contient huit paires d'amorces pour l'amplification de six marqueurs spécifiques de la méthylation et de deux marqueurs de contrôle. La disposition des GynTect® Strips est présentée dans la Figure 3.

Une GynTect® Strip complète est nécessaire pour analyser un seul échantillon de patiente.



Figure 3 Disposition des GynTect® Strips

Chaque position 1 à 6 des bandelettes PCR contient l'amorce d'un des six marqueurs spécifiques de méthylation. La position 7 des bandelettes contient les amorces pour le contrôle de qualité du bisulfite (ACHE), la position 8 les amorces pour le contrôle de qualité de la méthylation (IDS-M).

### 4.2. Contrôles

La conception du kit GynTect® comprend plusieurs contrôles. Ces contrôles permettent de surveiller les étapes critiques du test, notamment la qualité de l'échantillon et le traitement au bisulfite (ACHE), l'état de méthylation de l'échantillon (IDS-M) et la qualité des réactions PCR.

#### 4.2.1. Contrôle de qualité du traitement au bisulfite (ACHE)

Ce marqueur de contrôle vérifie la conversion réussie de tous les résidus de cytosine non méthylés en uracile et donc la qualité du traitement au bisulfite. À cet effet, une région d'ADN située au niveau de l'acétylcholine estérase humaine (ACHE) est amplifiée. Une amplification insuffisante de l'ACHE indique que le test n'est pas valable et doit être répété.

#### 4.2.2. Contrôle de qualité de la méthylation (IDS-M)

Ce contrôle permet l'amplification du gène imprimé IDS, qui est méthylé sur le deuxième chromosome X féminin (IDS-M). Si la réaction PCR génère une valeur Cp comprise entre 20 et 32, l'échantillon utérin est valable. Si aucune amplification n'est obtenue, le test doit être considéré comme non valable et doit être répété.

#### 4.2.3. Contrôle positif

Une matrice de contrôle est fournie pour surveiller la qualité de la réaction PCR. Pendant l'amplification de la matrice de contrôle GynTect® Positive Control (PC), chacun des huit marqueurs doit fournir une valeur Cp inférieure à 38. Dans le cas contraire, les réactions PCR ne sont pas valables et doivent être répétées.

#### 4.2.4. Contrôle négatif

Comme contrôle négatif, des réactions avec la matrice GynTect® Water (NTC - No Template Control, pas de contrôle avec la matrice) sont réalisées. Ces réactions doivent être négatives pour tous les marqueurs. Si des produits spécifiques apparaissent dans l'une ou l'autre des réactions, il est possible que des contaminations se soient produites et que le test GynTect® doive être répété.

## 5. MATERIAUX DE REFERENCE

Il n'existe pas de matériel de référence international.

## 6. CONTENU DU KIT

Tableau 2 Contenu du kit GynTect®

Composant	Symbole	Contenu	Volume / Quantité	
			GT003-06	GT003-10
GynTect® Mastermix	<b>PCR-MM</b>	2 x PCR mastermix <sup>1</sup>	1 x 1,1 ml	1 x 1,1 ml
GynTect® Strips	<b>STRIPS</b>	Bandelettes PCR <sup>2</sup> pour échantillons de patientes (capuchons verts)	6 bandelettes	10 bandelettes
		Bandelettes PCR <sup>2</sup> pour contrôles positifs (capuchons rouges)	3 bandelettes	1 bandelette
		Bandelettes PCR <sup>2</sup> pour contrôles négatifs (capuchons jaunes)	3 bandelettes	1 bandelette
GynTect® Caps	<b>CAPS</b>	Bandelettes de bouchons PCR	12 bandelettes de capuchons	12 bandelettes de capuchons
GynTect® Positive Control	<b>CONTROL+</b>	Contrôle positif	1 x 260 µl	1 x 90 µl
GynTect® Water	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau	1 x 2 ml	1 x 2 ml
Notice d'utilisation	-	Notice d'utilisation	1	1

<sup>1</sup> Contient tous les composants nécessaires à la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), à l'exception de l'amorce et de la matrice.

<sup>2</sup> Contient les amorces nécessaires à la PCR.

## 7. CONSOMMABLES ET EQUIPEMENT (NON FOURNIS AVEC LE KIT)

Le test GynTect® ne peut être effectué qu'avec le matériel et l'équipement répertoriés et uniquement par du personnel qualifié. Tous les équipements de laboratoire doivent être installés, entretenus, manipulés et étalonnés conformément aux instructions du fabricant.

On entend par température ambiante une température comprise entre 15 °C et 30 °C.

Tableau 3 Équipement requis

Équipement	N° de catalogue	Commande
Kit EpiTect® Fast Bisulfite (10) *	Z102	order@oncgnostics.com
Solution ThinPrep® PreservCyt® (20 ml)	-	via Hologic Inc.
Cervex-Brush® ou Cervex-Brush® Combi	-	via Rovers Medical Devices

\* Ne pas confondre le kit EpiTect® Fast Bisulfite (n° de catalogue QIAGEN : 59802) avec le kit EpiTect® Bisulfite !

L'équipement de laboratoire et les consommables suivants sont nécessaires pour effectuer le test GynTect®.

- Centrifugeuse pour éprouvettes à réaction de 0,5 ml/1,5 ml,  $\geq 10\ 000\ \text{xg}$
- Centrifugeuse pour bandelettes PCR
- Thermocycleur pour éprouvettes à réaction de 0,5 ml
- Mélangeur / agitateur à vortex
- Pipettes de différents volumes et embouts filtrants associés (stériles, sans DNase)
- Éprouvettes à réaction pour 0,5 ml/1,5 ml (sans DNase)
- Support d'éprouvettes à réaction pour éprouvettes de réaction de 0,5 ml/1,5 ml
- Éthanol 96 - 100 %, non dénaturé
- Dispositif PCR en temps réel, canal de détection pour FAM/SYBRGreen

Le kit GynTect® a été approuvé sur:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) avec bloc de 96 puits, l'adaptateur pour bandes PCR et LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0 (offre de service 3), évaluation avec la version 1.5.1.62
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) avec le logiciel CFX Maestro version 2.3
- CFX Opus 96 (Dx) Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) avec le logiciel CFX Maestro version 2.3

## 8. STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Transporté et stocké correctement, le kit GynTect® et ses composants peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. S'ils sont conservés dans les conditions indiquées et à l'abri de toute contamination, tous les réactifs contenus dans le kit restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée après ouverture (voir Tableau 4).

Tableau 4 Température de stockage du kit GynTect® et de l'équipement non fourni dans le kit

Équipement	Température de stockage
Kit GynTect®	2 °C à 8 °C
Kit EpiTect® Fast Bisulfite (10) hormis	15°C à 25°C
Spin Columns, DNA Protect Buffer, Buffer BD	2°C à 8°C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C à 30 °C
Cervex-Brush® ou Cervex-Brush® Combi	15 °C à 30 °C

## 9. CONSIGNES DE SECURITE

### 9.1. Généralités

Pour instaurer des méthodes de biologie moléculaire de pointe, suivre scrupuleusement les instructions ci-dessous afin de garantir une sécurité maximale pour le personnel du laboratoire et d'obtenir des résultats de qualité élevée:

- Comme il implique des processus de biologie moléculaire, tels que le traitement au bisulfite, l'amplification et la détection de l'ADN, ce kit est destiné uniquement au diagnostic *in vitro* et ne doit être utilisé que par du personnel formé aux pratiques de laboratoire pour le diagnostic *in vitro*.
- Avant d'utiliser le produit, lire attentivement le mode d'emploi. Ne prendre en compte que la version actuelle.
- Porter une blouse de laboratoire appropriée, des gants jetables et, si nécessaire, des lunettes de protection pour réaliser chaque étape.
- Éviter le contact direct avec les échantillons biologiques, ainsi que toute éclaboussure ou pulvérisation des échantillons.
- Le couvercle chauffé et le bloc d'incubation du thermocycleur peuvent atteindre des températures allant jusqu'à 110 °C. Il existe un risque d'échaudures. Respecter le mode d'emploi de l'appareil.
- Se laver minutieusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.
- Ne pas utiliser GynTect® si l'emballage des réactifs est endommagé. Dans ce cas, contacter votre fournisseur.
- Ne pas utiliser le kit GynTect® après expiration de la date de péremption et ne pas utiliser de réactifs périmés.

- Ne pas mélanger les réactifs issus de différents lots et ne pas mélanger les réactifs du kit avec les réactifs issus de fabricants tiers.
- N'utiliser que le matériel fourni avec le kit ou recommandé par le fabricant.
- Tous les équipements de laboratoire requis doivent être installés, étalonnés, manipulés et entretenus conformément aux instructions du fabricant.
- Le pipetage de petits volumes de liquide de l'ordre du microlitre nécessite de la pratique. S'assurer de pipeter les volumes requis avec les micropipettes aussi précisément que possible.
- Respecter les exigences réglementaires applicables à l'opérateur.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), telles que définies, par exemple, par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis ou l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), est présumé. Il convient en particulier d'examiner les recommandations relatives à la réalisation de tests d'amplification moléculaire.
- Le bon fonctionnement des appareils PCR n'est garanti qu'à température ambiante.

## 9.2. Répartition spatiale

En raison de la grande sensibilité analytique de la PCR, accorder une attention particulière au maintien de la pureté des composants du kit et des échantillons.

La PCR multiplie des sections de l'ADN de l'échantillon des millions, voire des milliards de fois. Même les plus petites quantités de ces produits PCR (par ex. également répandus sous forme d'aérosol) peuvent conduire à un résultat erroné s'ils sont transportés dans le matériel d'échantillonnage, dans les réactifs pour le traitement au bisulfite ou dans les réactifs PCR de ce kit.

Un flux de tâches propre et bien structuré est donc essentiel pour éviter les résultats erronés. À cette fin, il est indispensable de séparer les zones de laboratoire pour la pré-PCR et la post-PCR. Les équipements, les consommables, les blouses et les gants doivent être séparés dans chaque zone. Ne jamais transférer de blouses, de gants ou d'équipements d'une zone à l'autre. La Figure 4 illustre un exemple de laboratoire divisé en deux salles distinctes. Une zone est réservée au traitement au bisulfite et à la préparation de la PCR, tandis que la PCR est effectuée dans l'autre zone.

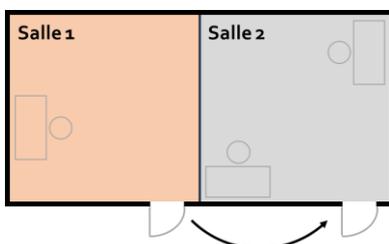


Figure 4 Répartition spatiale

La salle 1 est réservée au traitement au bisulfite et à la préparation de la PCR (au mieux : utiliser une hotte PCR). La salle 2 est réservée à la PCR, à la détection des marqueurs et à l'analyse des résultats.

### 9.3. Éviter la contamination

- Porter une blouse de laboratoire et des gants jetables pendant toutes les étapes.
- Changer fréquemment les gants jetables et à chaque contamination (suspectée) avec des réactifs ou le matériel d'échantillonnage.
- Décontaminer toutes les surfaces, les équipements et les fournitures avec une solution de nettoyage appropriée (produits destructeurs d'ADN).
- Ne pas toucher l'intérieur des éprouvettes à réaction, ni même leurs capuchons.
- Lors du pipetage, toujours utiliser des embouts filtrants (exempts de DNase, de RNase et d'ADN humain) afin d'exclure toute contamination croisée par les aérosols générés lors du pipetage. Les embouts doivent impérativement être remplacés entre chaque étape de pipetage.
- Il est important d'effectuer des contrôles négatifs afin de détecter une éventuelle contamination.

### 9.4. Instructions de manipulation

- Stocker les composants non utilisés dans leur emballage d'origine.
- Effectuer toutes les étapes de centrifugation à température ambiante.
- Le flux de tâches peut être interrompu avec avoir effectué le traitement au bisulfite. À ce moment, les échantillons peuvent être stockés pendant une semaine entre 2 °C et 8 °C ou jusqu'à deux mois entre -15 °C et -30 °C.
- Ne jamais toucher l'intérieur des capuchons colorés des bandelettes PCR en les retirant des bandes et les éliminer de manière professionnelle.
- Ne pas toucher les GynTect® Strips ni les GynTect® Caps sans porter de gants jetables pendant l'intégralité de la procédure, faute de quoi des signaux de fluorescence non spécifiques peuvent apparaître.
- Étiqueter les GynTect® Strips et les GynTect® Caps au mauvais endroit peut entraîner des signaux de fluorescence non spécifiques pendant les cycles de PCR.
- Les GynTect® Strips et les GynTect® Caps sont conçus pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés.
- Conserver les GynTect® Strips et les GynTect® Caps non utilisés dans leur emballage d'origine.

## 10. MISE AU REBUT

Le kit GynTect® non utilisé et ses composants peuvent être éliminés sans autres précautions particulières. Les échantillons des patientes ainsi que les éprouvettes à réaction usagés doivent être traités comme des déchets infectieux. Tous les réactifs doivent être éliminés conformément aux dispositions légales.

## 11. PROCEDURE GYNTECT®

Le chapitre suivant contient une description détaillée des différentes étapes du traitement, du prélèvement des échantillons à l'analyse des données. Le kit GynTect® GToo3-10 contient un contrôle positif et un contrôle négatif pour une seule analyse GynTect®. Les dix échantillons doivent être utilisés dans un seul flux de tâches.

### 11.1. Chronologie du flux de tâches

Au total, GynTect® peut être traité en moins de 4 heures, le temps de manipulation active étant d'environ 2 heures. Avant d'effectuer le premier test GynTect®, il convient de réserver environ 15 minutes à la mise en place d'un programme de matrice PCR pour le test.

La Figure 5 présente les détails du flux de tâches.

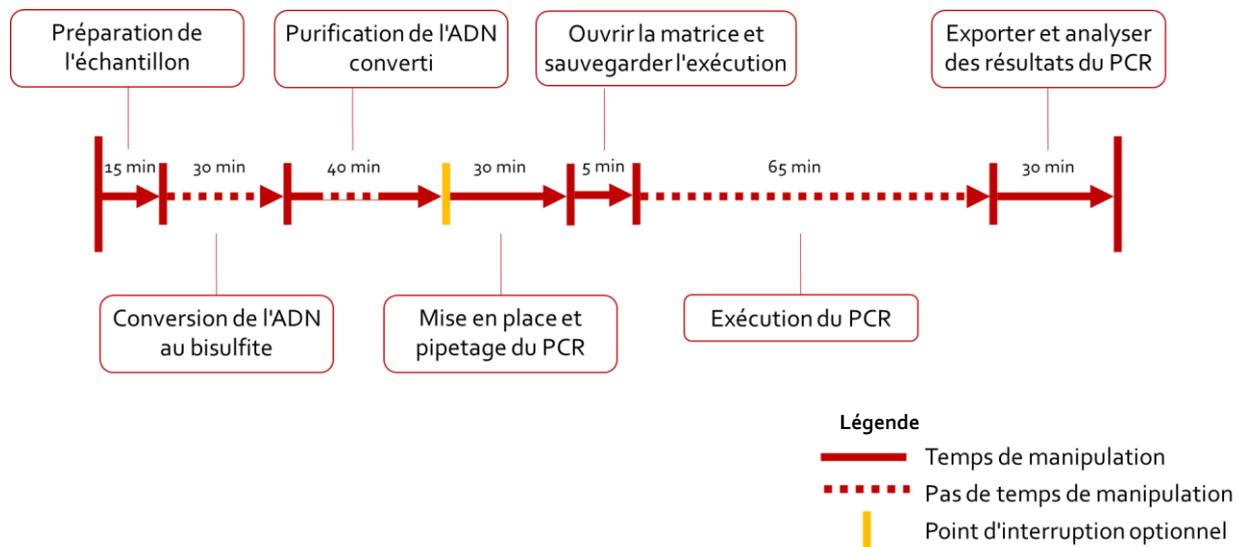


Figure 5 Chronologie du flux de tâches GynTect®

### 11.2. Échantillonnage

Le kit d'échantillonnage et le kit de bisulfite ne font pas partie du kit GynTect®. Le flacon de solution ThinPrep® PreservCyt® (Hologic) et le Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) peuvent être achetés auprès de leurs fabricants respectifs. Le prélèvement d'un échantillon utérin par le médecin doit être effectué conformément aux instructions du fabricant et aux directives généralement acceptées pour le prélèvement d'un échantillon de frottis du col utérin [7].

**Important:** La brosse doit être jetée après l'échantillonnage et ne doit pas rester dans le milieu d'échantillonnage, sous peine d'affecter les performances de GynTect®.

La solution ThinPrep® PreservCyt® doit être utilisée comme fluide de frottis. L'utilisation d'un autre fluide d'échantillon ne fait pas partie de l'approbation du test GynTect®.

La garantie de la bonne qualité de l'échantillon d'ADN utilisé est une condition préalable importante pour la validité du test. Un échantillonnage, un traitement au bisulfite et un stockage de l'ADN inappropriés peuvent conduire à des résultats non valables, voire faussement négatifs.

Les échantillons du col de l'utérus peuvent être transportés au laboratoire pour être testés sans réfrigération. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 1,5 an à une température comprise entre 2 °C et 30 °C.

### 11.3. Préparation de l'échantillon

Les étapes suivantes doivent être effectuées dans la zone de préparation des échantillons (salle 1).

**Important:** La brosse doit être jetée avant de traiter l'échantillon, si elle est encore placée dans le flacon d'échantillonnage.

1. Passer au vortex un échantillon de patiente pendant 5 secondes à vitesse maximale et transférer immédiatement 1 ml de l'échantillon dans une éprouvette de 1,5 ml.

**Attention:** Les cellules se déposent très rapidement au fond du flacon. L'échantillon de la patiente doit être utilisé dans un délai de 10 secondes après le passage au vortex.

2. Centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 10 000 xg.
3. Retirer avec précaution 900 µl de surnageant au-dessus du culot. Ne pas retirer ou détruire le culot.

**Attention:** Le culot est plus ou moins bien fixé, en fonction de l'échantillon.

4. Passer au vortex le culot pendant 3 secondes pour le remettre en suspension. 40 µl de l'échantillon remis en suspension sont utilisés pour le traitement au bisulfite.

### 11.4. Traitement au bisulfite des échantillons

Le kit de bisulfite ne fait pas partie du kit GynTect®. GynTect® a été approuvé avec le EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen).

**Attention:** Le protocole d'origine du EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen) a été modifié. L'utilisation de ce protocole modifié est une condition préalable pour satisfaire aux paramètres de performances indiqués.

#### 11.4.1. Conversion au bisulfite de l'ADN

1. Préparer les tampons du kit bisulfite conformément au Tableau 5.

**Important:** **Buffer BL** est utilisé sans *Carrier DNA*. Stocker ou transporter **Buffer BL** à des températures basses peut entraîner la formation de précipités. Dans ce cas, résoudre la précipitation en réchauffant doucement (37 °C) et en agitant le **Buffer BL**.

Tableau 5 Tampon pour le EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Tampon	Ajout d'éthanol	Température de stockage
Buffer BL *	-	Température ambiante
Buffer BW	30 ml d'éthanol (96 - 100 %)	Température ambiante
Buffer BD	27 ml d'éthanol (96 - 100 %)	2 °C à 8 °C

\* Ne pas ajouter *Carrier DNA*, contrôle de la qualité (voir remarque)

2. Pour chaque échantillon, préparer un mélange réactionnel de traitement au bisulfite en utilisant des éprouvettes de 0,5 ml selon le Tableau 6.

**Important:** Stocker ou transporter la **Bisulfite Solution** à des températures basses peut entraîner la formation de précipités. Dans ce cas, résoudre la précipitation en réchauffant doucement (37 °C) et en agitant la **Bisulfite Solution**.

Tableau 6 Préparation du traitement au bisulfite

Composé	Par réaction
Bisulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Échantillon préparé et remis en suspension	40 µl
Volume total par réaction	140 µl

\* contrôle de la qualité (voir remarque)

**Attention:** La **Bisulfite Solution** ne se conserve pas. Une **Bisulfite Solution** n'est utilisable que pour une seule procédure, les restes doivent être jetés.

3. Passer au vortex le mélange réactionnel pour la conversion au bisulfite pendant 3 secondes à vitesse maximale, le centrifuger brièvement et le laisser à température ambiante jusqu'à utilisation ultérieure.

**Attention:** Le **DNA Protect Buffer** passe du vert au bleu si le pH du mélange se trouve dans la bonne plage. L'échantillon doit être traité en l'espace de 60 min.

4. Utiliser un thermocycleur avec un couvercle chauffé (100 °C) et programmer le thermocycleur selon le Tableau 7.

**Important:** Si le thermocycleur refuse les volumes atteignant 140 µl, utiliser le volume programmable suivant. Il n'est pas nécessaire de préchauffer le couvercle avant de démarrer la conversion.

Tableau 7 Conversion au bisulfite à l'aide d'un thermocycleur

Étape	Durée	Température
Dénaturation	5 min	95 °C
Incubation	10 min	60 °C
Dénaturation	5 min	95 °C
Incubation	10 min	60 °C
Fin de la réaction	Tenir*	20 °C

\* L'ADN converti peut rester dans le thermocycleur ou être stocké à température ambiante pendant la nuit (max. 16 h).

5. Placer les éprouvettes de 0,5 ml dans le bloc chauffant du thermocycleur et démarrer l'incubation.

**Attention:** Une fois la conversion au bisulfite effectuée, les échantillons doivent être stockés pendant la nuit (max. 16 heures) à température ambiante. Éviter le stockage réfrigéré (à des températures de 2 °C à 8 °C), faute de quoi les échantillons pourraient former des précipités et empêcher tout traitement ultérieur.

#### 11.4.2. Purification de l'ADN converti

6. Une fois la conversion au bisulfite terminée, passer au vortex l'éprouvette PCR pendant 3 secondes à vitesse maximale et centrifuger brièvement pour éliminer les gouttes à l'intérieur du couvercle.
7. Ajouter 310 µl de **Buffer BL** à chaque MinElute® Spin Column.  
**Important:** Étiqueter clairement le MinElute® Spin Column.
8. Ajouter l'échantillon (140 µl) à la colonne d'essorage et mélanger brièvement en effectuant 5 pipetages de haut en bas.  
**Important:** Ne pas toucher la membrane de la colonne avec la pointe de la pipette et éviter la formation de bulles. S'assurer que la solution est homogène et dénuée de stries après 5 pipetages de haut en bas.
9. Ajouter **250 µl d'éthanol** (96 - 100 %) à chaque colonne d'essorage, fermer le couvercle et mélanger brièvement en convertissant 5 fois le pivot de la colonne la tête en bas (180°).
10. Centrifuger chaque colonne d'essorage pendant 30 secondes à 18 000 xg et s'assurer que le liquide a passé la colonne dans le Collection Tube.
11. Retirer la colonne d'essorage de la centrifugeuse, jeter le flux et replacer la colonne d'essorage dans le Collection Tube.
12. Pour le lavage, ajouter **200 µl de Buffer BW** à la colonne d'essorage et centrifuger pendant 30 secondes à 18 000 xg.
13. Ajouter **200 µl de Buffer BD** à chaque colonne d'essorage, fermer le couvercle et incuber pendant 15 min à température ambiante (15 - 30 °C).
14. Une fois la désulfonation terminée, centrifuger la colonne d'essorage pendant 30 secondes à 18 000 xg.
15. Ajouter **200 µl de Buffer BW** et centrifuger pendant 30 secondes à 18 000 xg.
16. Retirer la colonne d'essorage de la centrifugeuse, jeter le flux et replacer la colonne d'essorage dans le Collection Tube.
17. Laver la colonne d'essorage avec **400 µl de Buffer BW** et centrifuger pendant 30 secondes à 18 000 xg.
18. Ajouter **200 µl d'éthanol** (96 - 100 %) à chaque colonne d'essorage et centrifuger pendant 30 secondes à 18 000 xg.
19. Placer la colonne d'essorage dans un nouveau Collection Tube de 2 ml et centrifuger pendant 60 secondes à 18 000 xg pour éliminer tout résidu de liquide.  
**Attention:** Ne pas sauter cette étape, faute de quoi l'éthanol résiduel pourrait nuire à la performance du test GynTect®.
20. Placer la colonne d'essorage dans une éprouvette propre de 1,5 ml (non fournie), ajouter 20 µl d'eau directement au centre de la membrane de la colonne d'essorage et fermer doucement le couvercle.

**Important:** Ne pas endommager la membrane de la colonne d'essorage et ne pas pipeter l'eau du côté de la colonne d'essorage.

21. Incuber la colonne d'essorage à température ambiante pendant 60 secondes puis centrifuger la colonne d'essorage pendant 60 secondes à 8 000 xg (élution).
22. Vérifier visuellement si le volume de l'éluat est correct.

**Facultatif:** À cette étape, les échantillons peuvent être stockés pendant une semaine maximum entre 2 °C et 8 °C ou jusqu'à 2 mois entre -15 °C et -30 °C.

### 11.5. PCR

Avant de commencer la PCR, s'assurer que le protocole de température de la PCR est programmé dans l'appareil de PCR en temps réel approprié afin de minimiser le temps entre la préparation et le début de la PCR. Pour établir le programme PCR sur la cobas z 480 Analyzer, procéder comme indiqué à la page 19. L'explication de la PCR sur le CFX96 Real-Time PCR System se trouve à partir de la page 22.

#### 11.5.1. Préparation et pipetage de la PCR

**Important:** Préparer et pipeter la PCR ne doit pas demander plus de 60 minutes. Cette étape est effectuée dans la salle 1 (zone pré-PCR).

Respecter la disposition des plaques décrite à la page 19 ou 22. Le contrôle positif (PC) doit être positionné à la ligne 11 et le contrôle négatif (NTC) à la ligne 12.

1. Ajouter **70 µl d'GynTect® Water** à chaque échantillon.
2. Passer les échantillons au vortex pendant 3 secondes à vitesse maximale et les centrifuger brièvement.
3. Sortir le **GynTect® Mastermix** du kit et utiliser pour chaque échantillons une **GynTect® Strip** (couvercle vert) et pour chaque contrôle une **GynTect® Strip** (contrôle positif : couvercle rouge, contrôles négatifs : couvercle jaune).
4. Placer les **GynTect® Strips** sur un support de PCR. Tenir compte de l'orientation des **GynTect® Strips** (voir Figure 6).

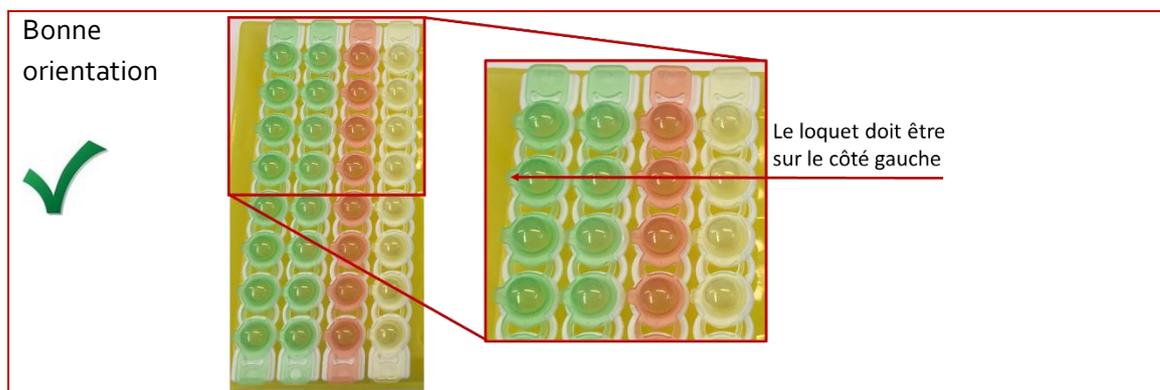


Figure 6 Orientation des GynTect® Strips

5. Passer au vortex le **GynTect® Mastermix** pendant 3 secondes à vitesse maximale et centrifuger brièvement.
6. Retirer les bandelettes au capuchon coloré et rond de la **GynTect® Strip** et les jeter.

7. Ajouter **10 µl** de **GynTect® Mastermix** à chaque éprouvette de **GynTect® Strip**.  
**Remarque:** On observe une coloration bleue. Elle fait office d'inspection visuelle et n'a aucun impact sur le résultat GynTect®.  
**Important:** Changer d'embout pour chaque éprouvette de bandelette, les **GynTect® Strips** contenant déjà les amorces pour la PCR.
8. Ajouter **10 µl d'échantillon** à chacun des huit puits des **GynTect® Strips**.  
**Important:** Changer les embouts pour chaque éprouvette de bandelette.  
**Remarque:** Conserver le reste des éluats de l'échantillon pour répéter la PCR GynTect® si nécessaire.
9. Fermer les **GynTect® Strips** directement après le pipetage à l'aide de **GynTect® Caps** plats et transparents.  
**Attention:** Éviter de toucher l'intérieur des **GynTect® Caps** et des **GynTect® Strips**. S'assurer que les **GynTect® Strips** sont fermement fermées. La meilleure façon d'effectuer l'inspection est de côté.
10. Passer au vortex le **GynTect® Positive Control** pendant 3 secondes à vitesse maximale et centrifuger.
11. Ajouter à chacun des huit puits de la **GynTect® Strip** pour le contrôle positif **10 µl** de **GynTect® Positive Control** et à chacun des huit puits de la **GynTect® Strip** pour le contrôle négatif **10 µl** d'**GynTect® Water**.
12. Fermer les **GynTect® Strips** directement après le pipetage à l'aide de **GynTect® Caps** plats et transparents.  
**Attention :** Éviter de toucher l'intérieur des **GynTect® Caps** et des **GynTect® Strips**. S'assurer que les **GynTect® Strips** sont fermement fermées. La meilleure façon d'effectuer l'inspection est de côté.
13. Étiqueter toutes les **GynTect® Strips** après avoir terminé le pipetage et fermé les nouveaux **GynTect® Caps** (voir Figure 7).

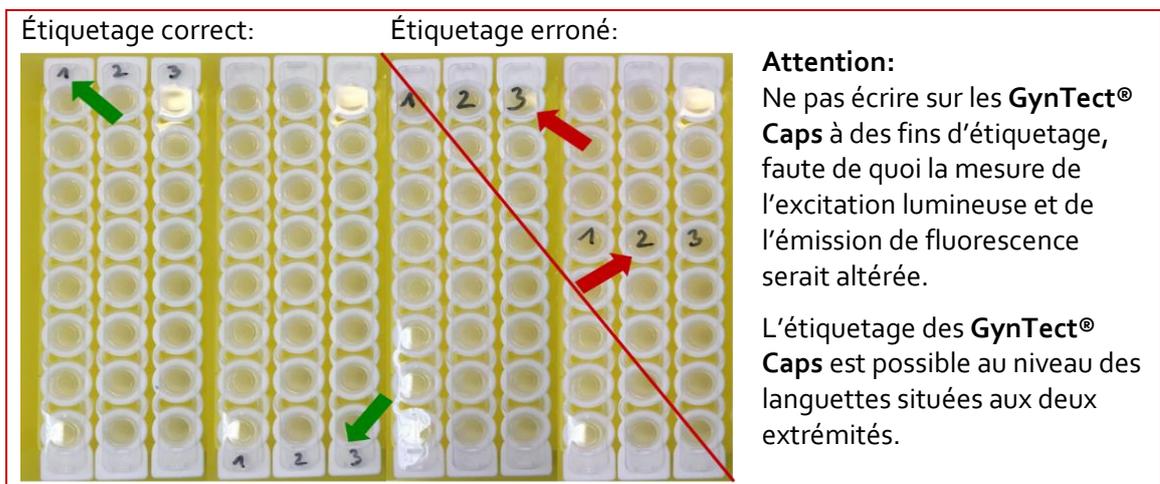


Figure 7 Étiquetage des GynTect® Strips

14. Passer au vortex toutes les **GynTect® Strips** fermées pendant 3 secondes à vitesse maximale et les centrifuger brièvement.

### 11.5.2. Réalisation de la PCR sur le cobas z 480 Analyzer

La section suivante explique comment réaliser le test GynTect® sur les systèmes PCR en temps réel comme le cobas z 480 Analyzer (marqué en bleu) et le CFX96 Real-Time PCR Detection System (marqué en vert). Toujours respecter les consignes du fabricant pour manipuler les appareils PCR.

La PCR doit être effectuée dans la salle 2.

#### 11.5.2.1. Création d'une matrice PCR

Si une matrice PCR a déjà été créée et enregistrée, la procédure se poursuit au point 11.5.2.2 *Lancement de la PCR*.

1. Allumer le cobas z 480 Analyzer et son ordinateur. En l'espace de 15 secondes, sélectionner « User defined Workflow » sur l'écran de l'ordinateur dans le BIOS afin de passer à un mode d'appareil librement programmable.
2. Sélectionner *New Experiment* pour créer une nouvelle matrice.

Dans l'onglet *Run Protocol*, paramétrer le *Detection Format* sur SYBR Green 1 /HRM Dye et le *Reaction Volume* sur 20 µl. Programmer le protocole de température conformément au Tableau 8.

Tableau 8 Protocole de température PCR sur le 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. Enregistrer le *Run-Template* sous le nom *GynTect*.

#### 11.5.2.2. Lancement de la PCR

En cas d'enregistrement antérieur de la matrice PCR, il est désormais possible d'y accéder. S'assurer que le bon protocole de température est défini.

1. Sous *Subset Editor*, générer la disposition recommandée des plaques (voir Figure 8 et Figure 9).

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

Figure 8 Exemple de disposition des plaques pour six échantillons

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

Figure 9 Exemple de disposition des plaques pour dix échantillons en utilisant GToo3-10

**Important:** La disposition des plaques n'est **pas** variable. Le contrôle positif (PC) doit être positionné à la ligne 11 et le contrôle négatif (NTC) à la ligne 12.

2. Sous *Sample Editor*, définir l'étiquetage de l'échantillon.
3. Placer les bandelettes verticalement dans l'appareil PCR dans l'ordre défini.

**Important:** Utiliser l'adaptateur pour les bandelettes PCR (à commander auprès de Roche Diagnostics GmbH).

4. Sauvegarder la PCR en cliquant sur le *disk-button* à l'endroit désiré en utilisant un nom univoque et lancer la PCR en cliquant sur le bouton *Start Run* dans l'onglet *Run Protocol*.

### 11.5.2.3. Exportation des données

Pour analyser la PCR directement sur l'ordinateur de le cobas z 480 Analyzer, continuer avec le point 11.5.2.4 *Réglage de l'évaluation dans le logiciel de l'appareil*.

Une fois la PCR terminée (Exécution terminée), exporter la PCR via  « Export » et enregistrer le fichier à l'endroit désiré.

#### 11.5.2.4. Réglage de l'évaluation dans le logiciel de l'appareil

En cas d'exportation de la PCR, démarrer le logiciel LightCycler® 480 sur un autre ordinateur et ouvrir/importer la PCR. Dans le cas contraire, réaliser l'analyse sur l'ordinateur de le cobas z 480 Analyzer.

1. Sélectionner l'algorithme *Abs Quant/Fit Points* dans l'éditeur *Analysis* et l'éventuel sous-ensemble défini.
2. Régler *Background* entre 5 et 20 dans l'onglet *Cycle Range*, et choisir en outre *Min Offset 4* et *Max Offset 19*. Pour garantir le réglage du premier cycle et du dernier cycle, la plage de cycles doit être comprise entre 1 et 42.
3. S'assurer dans l'onglet *Noise Band* que le *STD Multiplier* est réglé sur 12 et que la *Noise Band* est calculée automatiquement.
4. Régler l'onglet *Analysis Threshold* sur 0,5 et vérifier que le nombre de *Fit Points* est réglé sur 2.
5. Confirmer ensuite tous les paramètres en cliquant sur le bouton *Calculate* et effectuer l'analyse. Exporter le tableau de données via *Export Table* en cliquant avec le bouton droit de la souris sur un fichier .txt et l'enregistrer à l'emplacement souhaité en utilisant un nom univoque.
6. Retourner dans l'éditeur *Analysis* et choisir l'algorithme *Tm Calling* dans l'éditeur *Analysis* et le sous-ensemble éventuellement défini.
7. Cocher également la case *Height* à côté de *Tm* et confirmer tous les paramètres en cliquant sur le bouton *Calculate* et effectuer l'analyse. Exporter le tableau de données via *Export Table* en cliquant avec le bouton droit de la souris sur un fichier .txt et l'enregistrer à l'emplacement souhaité en utilisant un nom univoque.

Le chapitre 11.6 décrit l'analyse et l'interprétation des données PCR.

### 11.5.3. Réalisation de la PCR sur le CFX96 Real-Time PCR Detection System

Toujours respecter les consignes du fabricant pour manipuler les appareils PCR.

La PCR doit être effectuée dans la salle 2.

#### 11.5.3.1. Création d'une matrice PCR

1. Allumer l'appareil PCR.
2. Programmer le protocole de température PCR comme décrit dans le Tableau 9 en sélectionnant et en modifiant les étapes et les durées de température.

Tableau 9 Protocole de température de la PCR\*\* sur le CFX96 Real-Time PCR Detection System

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

\* Le signal de fluorescence est détecté par « Plate Read » au cours des étapes 3 et 6, ce qui est symbolisé par le symbole de la caméra.

\*\* Sur le système de détection PCR en temps réel CFX96, la vitesse de rampe par défaut est de 5 °C/sec. Ce réglage a été utilisé pour homologuer ce test DIV.

3. Régler le *Volume* à 20 µl et laisser le chauffage du *Lid* à 105 °C.
4. Enregistrer la matrice PCR en utilisant le nom *GynTect*.

#### 11.5.3.2. Lancement de la PCR

En cas d'enregistrement antérieur de la matrice PCR, il est désormais possible d'y accéder. S'assurer que le bon protocole de température est défini.

1. Placer les GynTect® Strips dans l'appareil PCR en les insérant verticalement dans les petits puits du bloc chauffant. Sélectionner une disposition de plaques adaptée (voir Figure 10 et Figure 11).

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

Figure 10 Exemple de disposition des plaques pour six échantillons

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

Figure 11 Exemple de disposition des plaques pour dix échantillons en utilisant GToo3-10

**Important:** La disposition des plaques n'est **pas** variable. Le contrôle positif (PC) doit être positionné à la ligne 11 et le contrôle négatif (NTC) à la ligne 12.

- Nommez l'exécution en utilisant un nom de fichier approprié. Notez que seuls les SYBR/FAM détectés avant le début de l'exécution.

#### 11.5.3.3. Exportation des données

Une fois la PCR terminée, exporter la PCR (fichier .pcrd).

#### 11.5.3.4. Réglages de l'évaluation dans le logiciel de l'appareil

- Ouvrir le logiciel Bio-Rad CFX et paramétrer dans un premier temps *Plate Type: BR White* sous *User* → *User Preferences* → *Plate* pour indiquer que du plastique blanc est utilisé.
- Importer le fichier .pcrd.
- Définir la disposition des plaques sous *Plate Setup* → *View/Edit Plate*. Saisir le nom sous *Sample Names*. Les emplacements libres sont marqués et peuvent être exclus de l'analyse en cochant *Exclude Wells in Analysis*. Confirmer la disposition des plaques en cliquant sur OK.
- Définir les réglages de l'analyse sous Réglages (voir Tableau 10).

Tableau 10 Réglages de l'analyse sur le CFX96 Real-Time PCR Detection System

Paramètres	Configuration
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. Sélectionner *Load a Preset View* → *Amplification + Melt* sous l'onglet *Custom Data View*. Définir manuellement le seuil dans *Melt Peak Chart* à « zéro » (« glisser-déposer »).
6. Pour exporter les données PCR, sélectionnez *Custom Export* dans l'onglet *Export* et procéder aux réglages suivants :
  - Format: Excel 2007 (\*.xlsx)
  - Données à exporter → vérifier les cases à cocher suivantes  
(*Include Run Information Header, Well, Fluorophore, Target Name, Content, Sample Name, Cq, Melt Temperature Melt Peak Height*)

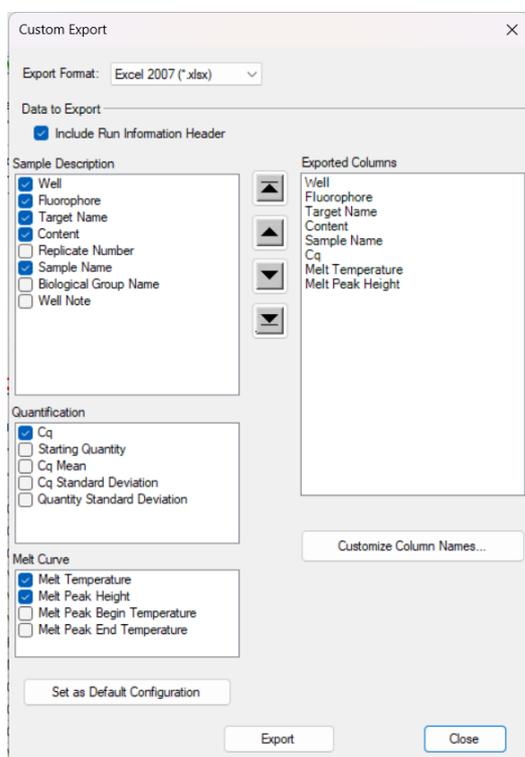


Figure 12 Exportation personnalisée

7. Appuyer sur le bouton *Export* et enregistrer le fichier .xlsx sous un nom univoque.

## 11.6. Évaluation et interprétation des données PCR

Le chapitre suivant décrit l'analyse des données exportées.

1. Ouvrir un tableur approprié et y copier les données PCR exportées.
2. Formater les données de manière à ce que les résultats de chaque échantillon soient écrits dans une colonne et que tous les échantillons soient écrits les uns à côté des autres.

Marqueur	Échantillon 1		Échantillon 2		Échantillon 3		Échantillon 4		Échantillon 5		Échantillon 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		

### Vérification de la validité de la PCR

3. La PCR est **valide** si le contrôle positif et négatif satisfont aux critères suivants (voir Tableau 11).

Tableau 11 Critères de validité des contrôles GynTect®

Marqueur	Contrôle positif			Contrôle négatif
	Valeur Ct	Plage de température de fusion (cobas)	Plage de température de fusion (CFX)	Valeur Ct
ASTN1	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 86 °C	78 °C – 86 °C	Aucune valeur*
DLX1	$\geq 20, \leq 38$	79 °C – 85 °C	77 °C – 85 °C	Aucune valeur*
ITGA4	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Aucune valeur*
RXFP3	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 85 °C	78 °C – 85 °C	Aucune valeur*
SOX17	$\geq 20, \leq 38$	81 °C – 87 °C	79 °C – 87 °C	Aucune valeur*
ZNF671	$\geq 20, \leq 38$	80 °C – 87 °C	78 °C – 87 °C	Aucune valeur*
ACHE	$\geq 20, \leq 38$	78 °C – 83 °C	76 °C – 83 °C	Aucune valeur*
IDS-M	$\geq 20, \leq 38$	78 °C – 88 °C	76 °C – 88 °C	Aucune valeur*

\* **Attention** : Aucune valeur Ct ne doit parvenir pour le contrôle négatif. Si une valeur Ct est obtenue pour un quelconque marqueur, il ne doit pas afficher une courbe de fusion spécifique au marqueur.

### Vérification de la validité et de la positivité des échantillons

4. Le résultat de l'échantillon de la patiente est **valide** si les marqueurs de contrôle ACHE et IDS M satisfont aux critères suivants (voir Tableau 12).

Tableau 12 Critères de validité des marqueurs de contrôle des échantillons de patientes

Marqueur	Valeur Ct	Plage de température de fusion (cobas)	Plage de température de fusion (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

- Le résultat GynTect® pour cet échantillon est considéré comme **invalide** si une **valeur Ct** > 0, < 20 est générée avec une température de fusion dans la plage définie.
- Pour les échantillons **valides**, utiliser l'équation suivante pour calculer la valeur  $\Delta Ct$  pour tous les marqueurs spécifiques de la méthylation détectés avec des valeurs Ct et des températures de fusion dans la plage définie (voir Tableau 13) :

Évaluation $\Delta Ct$	
$\Delta Ct = Ct_{(\text{Marqueur } x)} - Ct_{(\text{IDS-M})}$	

Pour chaque échantillon, les marqueurs spécifiques de méthylation sont considérés comme **positifs** si les **valeurs  $\Delta Ct$**  génèrent les valeurs correspondantes au Tableau 13.

Tableau 13 Critères de positivité pour le marqueur spécifique de méthylation pour les échantillons de patientes

Marqueur	Valeur Ct	Plage de température de fusion (cobas)	Plage de température de fusion (CFX)	Valeur $\Delta Ct$
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	$\leq 10,00$

**Important :** Analyser les courbes d'amplification et de fusion en ce qui concerne les points de données controversés et les caractéristiques des courbes. Les échantillons dont les caractéristiques des courbes sont controversées doivent être évalués invalides.

### Évaluation du test GynTect®

- Pour évaluer un test GynTect®, attribuer les valeurs suivantes pour les marqueurs positifs uniques (voir Tableau 14) et additionner les valeurs pour les six marqueurs :

Tableau 14 Valeurs des marqueurs GynTect®

Marqueur	Valeur, si le marqueur est positif	Valeur, si le marqueur est négatif
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Si la **somme** de toutes les valeurs des marqueurs est **égale ou supérieure à 6**, le test GynTect® de l'échantillon est **positif**.

Si la **somme** de toutes les valeurs des marqueurs est **égale ou inférieure à 5**, le test GynTect® de l'échantillon est **négatif**.

Un résultat positif au test GynTect® correspond à la présence d'une néoplasie cervicale intra-épithéliale ou d'un carcinome du col de l'utérus. Le résultat du test GynTect® ne doit pas être utilisé pour prendre une décision thérapeutique finale. Il doit être évalué en combinaison avec d'autres résultats cliniques.

## 12. PERFORMANCE DE GYNTECT®

Les données de performance affichées ici ont été collectées sur le cobas z 480 Analyzer.

### 12.1. Performance analytique

#### 12.1.1. Sensibilité analytique - détection de l'ADN méthylé

La sensibilité analytique du test PCR a été déterminée en utilisant de l'ADN génomique humain méthylé et converti au bisulfite. Les limites de détection correspondantes sont résumées dans le Tableau 15. Les séries de dilution ont été testées dans trois expériences indépendantes, chacune en trois exemplaires. En utilisant des prélèvements normaux, 20 à 50 ng sont utilisés pour le test.

Tableau 15 Sensibilité analytique du test PCR - partie 1

Quantité d'ADN utilisée	Nombre de cellules testées *	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0,2 ng	30 cellules	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9
0,1 ng	15 cellules	9 / 9	9 / 9	9 / 9	8 / 8	8 / 8	9 / 9
0,05 ng	7,5 cellules	9 / 9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	5 / 9	9 / 9
0,02 ng	3 cellules	7 / 9	8 / 9	6 / 9	9 / 9	6 / 9	8 / 9
0,01 ng	1,5 cellules	5 / 9	5 / 9	6 / 9	8 / 9	5 / 9	6 / 9
0,005 ng	< 1 cellule	8 / 9	7 / 9	4 / 9	6 / 9	1 / 9	6 / 9
0,002 ng	< 1 cellule	3 / 9	3 / 9	1 / 9	2 / 9	0 / 9	1 / 9

\* une cellule contient environ 6 à 7 pg d'ADN génomique

La limite de détection globale, à laquelle les marqueurs spécifiques de méthylation sont détectables dans toutes les réactions, se situe à 15 cellules (0,1 ng).

Par ailleurs, un mélange d'ADN composé d'ADN génomique humain méthylé et converti au bisulfite et d'ADN génomique humain non méthylé et converti au bisulfite a été testé dans des expériences similaires. Dans chaque test, 20 ng et 100 ng d'ADN ont été utilisés. Les séries de dilution ont été testées dans trois expériences indépendantes, chacune en trois exemplaires (voir Tableau 16).

Tableau 16 Sensibilité analytique du test PCR - partie 2

Pourcentage d'ADN méthylé	Quantité totale d'ADN	ASTN1 ΔCp ≤ 8	DLX1 ΔCp ≤ 9	ITGA4 ΔCp ≤ 9	RXFP3 ΔCp ≤ 9	SOX17 ΔCp ≤ 9	ZNF671 ΔCp ≤ 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

\* Un échantillon sur neuf s'est révélé négatif pour le marqueur ACHE et doit être exclu.

La limite de détection pour les marqueurs spécifiques de méthylation a été déterminée à 1 % d'ADN méthylé pour un échantillon de 20 ng et à 10 % pour un échantillon de 100 ng d'ADN par test.

Les résultats d'une expérience de spike-in de cellules SiHa dans des échantillons de patientes montrent que dans des échantillons de patientes avec une concentration d'au moins  $3 \times 10^5$  cellules par ml, une fraction de 0,1 % de cellules méthylées peut être détectée de manière fiable.

### 12.1.2. Spécificité analytique – détection de l'ADN non méthylé

La spécificité analytique du test PCR a été déterminée à l'aide de fragments PCR non méthylés convertis au bisulfite, d'une longueur de 10 à 12 kb, représentant le génome humain complet. Les expériences ont été réalisées avec une détermination de 5 fois, les résultats sont résumés dans le Tableau 17. Le marqueur ACHE a assuré la validité des échantillons. Aucun résultat positif du test GynTect® n'a été obtenu jusqu'à une concentration de 750 ng d'ADN non méthylé converti au bisulfite (ADNbi).

Tableau 17 Spécificité analytique du test PCR

ADN utilisé	ASTN1 Cp ≤ 42	DLX1 Cp ≤ 42	ITGA4 Cp ≤ 42	RXFP3 Cp ≤ 42	SOX17 Cp ≤ 42	ZNF671 Cp ≤ 42
0 ng d'ADNbi non méthylé	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
100 ng d'ADNbi non méthylé	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5
250 ng d'ADNbi non méthylé	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
500 ng d'ADNbi non méthylé	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
750 ng d'ADNbi non méthylé	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
75 ng d'ADNg méthylé	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

## 12.2. Précision

### 12.2.1. Répétabilité

20 échantillons différents ont été testés trois fois avec GynTect®. Dans chaque cas, une nouvelle préparation et un traitement au bisulfite des échantillons ont été réalisés. Les trois expériences ont été réalisées par une seule personne, mais à des jours différents. 16 échantillons ont donné des résultats identiques en 3 / 3. Ainsi, 80 % des échantillons peuvent avoir une répétabilité de 100 % dans trois expériences.

### 12.2.2. Reproductibilité

20 échantillons différents ont été testés trois fois avec GynTect® dans des laboratoires indépendants. Dans chaque cas, une nouvelle préparation et un traitement au bisulfite des échantillons ont été réalisés et des appareils PCR différents ont été utilisés (cobas z 480 Analyzer et LightCycler II 480). La comparaison de deux résultats de chaque échantillon génère trois évaluations par échantillon (laboratoire a contre laboratoire b, laboratoire b contre laboratoire c, laboratoire a contre laboratoire c). Les données ainsi obtenues, 90 % des évaluations ont donné des résultats identiques. L'évaluation de la comparaison valide donne une reproductibilité de 96,43 %.

## 12.3. Robustesse

Les variations suivantes du profil de température de la PCR ont été testées, sans qu'aucune déviation n'ait été observée dans le résultat final de GynTect® (réalisé avec quatre échantillons différents et un NTC) :

Tableau 18 Variations du profil de température

Déviaton du protocole d'origine	Effets sur la positivité GynTect® PC	Décalage moyen de la valeur Cp tous les marqueurs
65 °C Température de recuit	Aucun	< 1
67 °C Température de recuit	Aucun	< 1
92 °C Température de dénaturation	Aucun	< 1
96 °C Température de dénaturation	Aucun	< 1
96 °C Température de dénaturation & 10 sec Dénaturation & 30 sec Recuit/Élongation	Aucun	Jusqu'à 1.12 en plus
96 °C Température de dénaturation & 20 sec Dénaturation & 40 sec Recuit/Élongation	Aucun	< 1

Le positionnement de l'échantillon dans l'appareil PCR n'influe en rien sur le résultat du test GynTect®.

#### 12.4. Performance clinique

Les échantillons de patientes utilisés ont été obtenus auprès d'hôpitaux européens (Allemagne, Portugal, Slovaquie).

Le traitement au bisulfite des échantillons des patientes a été effectué comme décrit dans le chapitre 11.4.

Pour déterminer la performance clinique de GynTect®, 321 échantillons de patientes dotés des caractéristiques suivantes ont été analysés : Pap I (n = 199 ; 62 %), CIN 1 (n = 20 ; 6.2 %), CIN 2 (n = 28 ; 8.7 %), CIN 3 (n = 64 ; 19.9%), carcinome du col de l'utérus (n = 10 ; 3.1 %).

La sensibilité et la spécificité cliniques ont été calculées sur la base du seuil établi.

Tableau 19 Performance clinique de GynTect®

Recherche	Détection 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 = confidence interval (Intervalle de confiance)

Tableau 20 Sensibilité et spécificité

Sensibilité pour CIN 3+	Spécificité pour CIN 3+	Taux de faux positifs pour Pap I
67,6 %	89,9 %	4,0 %

### 13. LIMITES DE LA METHODE

- L'interprétation des résultats du test GynTect® doit toujours se faire en conjonction avec les résultats d'autres procédures de diagnostic en laboratoire et en tenant compte du tableau clinique.
- Les spécifications figurant dans le mode d'emploi, par exemple les volumes de pipetage, les temps d'incubation, les températures et les étapes de préparation, doivent être respectées afin d'éviter des résultats erronés.
- Un échantillonnage et un stockage corrects sont essentiels pour les résultats des tests.
- En principe, on ne peut exclure, dans les procédures de test de biologie moléculaire, que d'autres variantes de séquence très rares puissent influencer le résultat du test, qui ne sont pas encore couvertes par les sources consultées pour l'analyse de la spécificité et de la sensibilité des amorces et des sondes.
- Des performances non spécifiées de l'instrument, ainsi que des écarts par rapport à la procédure de test décrite, aux conditions de stockage spécifiées, aux matériaux, à l'équipement ou à l'échantillon recommandé, peuvent entraîner des différences par rapport aux résultats obtenus lorsque toutes les spécifications sont respectées.
- Les contrôles internes et externes fournis permettent de détecter les erreurs. Ils ne permettent cependant pas de détecter toutes les erreurs possibles. Il incombe à l'utilisateur de valider toute modification ou, si nécessaire, les appareils utilisés et de s'assurer de la conformité avec les spécifications de l'appareil.

### 14. REFERENCES

- [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 – Deuxième édition

## 15. RESPONSABILITE

Le kit GynTect® ne doit être utilisé que conformément à l'usage auquel il est destiné. Oncnostics GmbH décline toute responsabilité pour toute utilisation autre (par ex. le non-respect du présent mode d'emploi et une utilisation non conforme) et les dommages qui en résultent.

## 16. QUESTIONS ET PROBLEMES

Vous avez des questions ou rencontrez des problèmes avec le produit ? N'hésitez pas à contacter votre interlocuteur oncnostics GmbH.

L'assistance technique oncnostics GmbH est joignable du lundi au vendredi de 08h00 à 16h00 au: **+49 (0) 3641 5548500**.

En dehors de ces horaires, vous pouvez nous contacter par e-mail à l'adresse suivante: **gyntect@oncnostics.com**.

### oncnostics GmbH

Löbstedter Straße 41

07749 Jena, Allemagne

Direction : Dr Alfred Hansel, Dr Martina Schmitz

En cas d'erreur au cours du traitement des échantillons du col de l'utérus, de la réalisation de la PCR, de l'analyse des données et/ou de l'échec de l'ensemble du test GynTect® en raison de l'un des contrôles, procéder comme indiqué ci-dessous.

Tableau 21 Dépannage

Problème et cause	Remarques et suggestions
<b>CENTRIFUGEUSE</b> Aucune centrifugeuse disponible pour les bandelettes/plaques PCR	Agiter vigoureusement la bandelette de 8 puits avec le poignet jusqu'à ce que tout le liquide soit au fond des puits. L'intérieur du couvercle doit être exempt de gouttelettes, répéter l'opération si nécessaire.
<b>TEMPÉRATURES DE FUSION INVALIDES</b> La GynTect® Strips a été placée dans le système PCR à une rotation de 180°.  Les courbes d'amplification et de fusion sont visibles, mais les températures de fusion s'écartent considérablement des exigences du manuel.	La température de fusion de la position B doit correspondre à la température de fusion de la position G. Les puits A et B montrent une amplification pour toutes les GynTect® Strips, à l'exception du contrôle négatif. Les échantillons doivent être analysés.  Contacter oncnostics GmbH.

## NON / INVALIDES RÉSULTAT PCR

Valeur Ct du marqueur IDS-M supérieure à la valeur cible

Répéter le test de l'échantillon en utilisant un nouveau test GynTect®.

Répéter le test de l'échantillon en utilisant un nouveau test GynTect® et éventuellement un volume d'échantillon plus élevé (2 ml à 3 ml). Si le résultat négatif persiste pour les marqueurs, l'échantillon de la patiente ne peut pas faire l'objet d'une analyse.

Dépassement de la valeur cible pour le GynTect® Positive Control et/ou le GynTect® Negative Control

Répéter GynTect® pour tous les échantillons avec des éluats d'échantillons remplis (ajouter 80 µl GynTect® Water).

## 17. REMARQUES COMPLEMENTAIRES

Avis réglementaire destiné aux clients de l'Union européenne : vous êtes tenu de signaler à votre autorité compétente et à oncgnostics GmbH tout incident grave survenu en rapport avec le produit.

La version actuelle de la fiche de données de sécurité pour ce produit est disponible dans le centre de téléchargement sur le site web (<http://www.oncgnostics.com/en/downloadcenter/>) ou peut être demandée par e-mail à l'adresse suivante : [gyntect@oncgnostics.com](mailto:gyntect@oncgnostics.com).

## 18. SIGNIFICATION DES SYMBOLES

Symbole	Signification	Symbole	Signification
	Mastermix		Limitation de la température
	Bandelettes PCR		Date de péremption
	Capuchons		Suffit pour <n> tests
	Contrôle positif		Fabricant
	Eau		Consulter le mode d'emploi (IFU)
	Diagnostic <i>in vitro</i>		Stocker dans l'obscurité
	Code du lot		Ne pas réutiliser
	Numéro de catalogue		Marquage CE

## 19. LISTE DES MODIFICATIONS

Version précédente (Date de parution)	Modifications
3.5 (Mai 2022)	<ul style="list-style-type: none"><li>– Restructuration, déplacement des chapitres dans le mode d'emploi</li><li>– Chapitre 11.2 Échantillonnage<ul style="list-style-type: none"><li>○ Adaptation des conditions de stockage des échantillons du col de l'utérus</li></ul></li><li>– Chapitre 11.5.2 Réalisation de la PCR sur le cobas z 480 Analyzer<ul style="list-style-type: none"><li>○ Position fixe du PC (ligne 11) et NTC (ligne 12)</li><li>○ Suppression des captures d'écran</li></ul></li><li>– Ajout du chapitre 11.5.3 Réalisation de la PCR sur le CFX96 Real-Time PCR Detection System</li><li>– Les chapitres suivants ont été ajoutés :<ul style="list-style-type: none"><li>○ Chapitre 5 Matériaux de référence</li><li>○ Chapitre 13 Limites de la procédure</li><li>○ Chapitre 14 Références</li><li>○ Chapitre 15 Responsabilité</li><li>○ Chapitre 17 Remarques complémentaires</li><li>○ Chapitre 19 Liste des modifications</li></ul></li></ul>

## 20. PROTOCOLE SUCCINCT

Vous trouverez ci-dessous un modèle de protocole succinct sous forme de liste de contrôle.

Avant d'utiliser ce protocole succinct, lire l'intégralité des instructions avec toutes les remarques et conseils indiqués au chapitre 11.

Le kit de bisulfite ne fait pas partie du kit GynTect®. Le traitement au bisulfite des échantillons doit être effectué à l'aide du kit EpiTect® Fast Bisulfite (10).

## PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- Passer au vortex un échantillon de patiente pendant 5 secondes à vitesse maximale et transférer 1 ml de fluide dans une éprouvette de 1,5 ml
- Centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 10 000 xg
- Retirer 900 µl de surnageant au-dessus du culot et l'éliminer

## TRAITEMENT AU BISULFITE DES ECHANTILLONS

- Préparer les tampons du EpiTect® Fast Bisulfite Kit conformément au tableau a

Tableau a Composition du tampon pour le EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Tampon	Ajout d'éthanol
Buffer BL*	-
Buffer BW	30 ml d'éthanol (96 - 100 %)
Buffer BD	27 ml d'éthanol (96 - 100 %)

\* ne pas ajouter Carrier RNA, contrôle de la qualité

- Préparer la réaction selon le tableau b dans une éprouvette de 0,5 ml, mélanger au vortex et centrifuger

Tableau b Réaction du bisulfite

Composé	Par réaction
Bisulfite Solution*	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Échantillon remis en suspension	40 µl
Volume total/réaction	140 µl

\* Contrôle de la qualité

- Conversion à l'aide d'un thermocycleur, vérifier le profil de température conformément au Tableau 7
- Passer au vortex les échantillons et les centrifuger brièvement
- Ajouter **310 µl de Buffer BL** à MinElute® Spin Column
- Ajouter l'échantillon et pipeter 5 x de haut en bas
- Ajouter **250 µl d'éthanol** (96 - 100 %), mélanger 5 x en convertissant le pivot de colonne la tête en bas
- Centrifuger la colonne pendant 30 secondes à 18 000 xg et jeter le flux
- Ajouter **200 µl de Buffer BW** et centrifuger la colonne pendant 30 secondes à 18 000 xg
- Ajouter **200 µl de Buffer BD** et incuber pendant 15 min à température ambiante
- Centrifuger la colonne pendant 30 secondes à 18 000 xg
- Ajouter **200 µl de Buffer BW** et centrifuger la colonne pendant 30 secondes à 18 000 xg et jeter le flux
- Ajouter **400 µl de Buffer BW** et centrifuger la colonne pendant 30 secondes à 18 000 xg

- Ajouter **200 µl d'éthanol** (96 - 100 %) et centrifuger la colonne pendant 30 secondes à 18 000 xg
- Placer la colonne dans un nouveau Collection-Tube de 2 ml et centrifuger la colonne pendant 60 secondes à 18 000 xg
- Placer la colonne dans une éprouvette d'1,5 ml, ajouter **20 µl d'eau** et incuber pendant 60 secondes à température ambiante
- Centrifuger la colonne pendant 60 secondes à 8 000 xg
- Point de rupture facultatif* : le flux de tâches peut être interrompu à cette étape, les échantillons peuvent être stockés

### PREPARATION ET PIPETAGE DE LA PCR

- Ajouter **70 µl d'GynTect® Water** à chaque échantillon, passer au vortex et centrifuger brièvement
- Passer au vortex et centrifuger brièvement **GynTect® Mastermix**
- Retirer les capuchons de couleur des **GynTect® Strips** à utiliser
- Ajouter **10 µl de GynTect® Mastermix** à chaque puits de réaction
- Ajouter **10 µl d'échantillon** ou de **GynTect® Positive Control** ou d'**GynTect® Water**
- Fermer les **GynTect® Strips** avec les **GynTect® Caps**
- Passer au vortex et centrifuger brièvement les **GynTect® Strips**

### PERFORMANCE DE LA PCR

- Démarrer l'appareil, ouvrir le logiciel et sélectionner la matrice (GynTect)
- Nommer la PCR individuellement, préparer la disposition des plaques et vérifier le profil de température
- Enregistrer la PCR
- Placer les **GynTect® Strips** dans l'appareil et lancer la PCR
- Une fois la PCR terminée, procéder aux réglages de l'évaluation et exporter le fichier .txt ou .xlsx

## ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS DE LA PCR

- Ouvrir les fichiers exportés (.txt ou .xlsx) dans un tableur approprié
- Vérifier les résultats du **Contrôle positif** et du **Contrôle négatif** de tous les marqueurs
- Vérifier la validité et la positivité de tous les échantillons conformément au Tableau c

Tableau c Critères de validité et de positivité

Marqueur	Valeur Ct	Plage de température de fusion (cobas)	Plage de température de fusion (CFX)	$\Delta Ct$ (Marqueur x - IDS-M)	Critères de
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 86 °C	78 °C - 86 °C	$\leq 8,00$	positivité
DLX1	$\geq 20, \leq 42$	79 °C - 85 °C	77 °C - 85 °C	$\leq 9,00$	
ITGA4	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	$\leq 9,00$	
RXFP3	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	$\leq 9,00$	
SOX17	$\geq 20, \leq 42$	81 °C - 87 °C	79 °C - 87 °C	$\leq 9,00$	
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 87 °C	78 °C - 87 °C	$\leq 10,00$	
ACHE	$\geq 20, \leq 42$	78 °C - 83 °C	76 °C - 83 °C	-	validité
IDS-M	$\geq 20, \leq 32$	78 °C - 88 °C	76 °C - 88 °C	-	

- Évaluer les résultats GynTect®

Tableau d Valeurs des marqueurs GynTect®

Marqueur	Valeur, si le marqueur est positif	Valeur, si le marqueur est négatif
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Somme de toutes les valeurs  $\geq 6$

→ GynTect® positif

Un résultat positif au test GynTect® correspond à la présence d'une néoplasie cervicale intra-épithéliale ou d'un carcinome du col de l'utérus. Le résultat du test GynTect® ne doit pas être utilisé pour prendre une décision thérapeutique finale. Il doit être évalué en combinaison avec d'autres résultats cliniques.