



GynTect®

UDI-DI básico: 426076785GYNTECTYM

Instruções de utilização

REF



UDI-DI

GT003-06

6 amostras

4260767851017

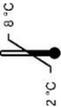
GT003-10

10 amostras

4260767851116



Por favor, leia atentamente estas instruções antes de realizar o teste GynTect®. Siga as instruções precisamente na ordem indicada para garantir a confiança dos resultados do teste.



GynTect® é um kit de diagnóstico *in vitro* para a deteção qualitativa de seis indicadores epigenéticos em ADN bissulfito-convertido de amostras cervicais de mulheres com um resultado positivo no teste HPV ou um resultado pouco claro no teste Papanicolaou. Um resultado positivo no teste GynTect® correlaciona-se com a presença de uma neoplasia intraepitelial cervical ou de um carcinoma cervical.

Reservado ao uso para diagnóstico *in vitro* por pessoal qualificado.

Revisão 6 (setembro de 2024)
Tradução lançada em outubro de 2024



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



TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO

O GynTect® Kit é enviado à temperatura ambiente. O limite de temperatura é monitorizado pelo ponto de medição de temperatura. Por favor, controle o ponto de medição quanto a alterações da cor (ver Figura 1) imediatamente após a receção do kit, e verifique se a embalagem secundária, selo e embalagem primária estão danificados. Após a receção, o kit deve ser refrigerado imediatamente entre 2 °C e 8 °C e guardado longe da luz. Transporte e armazenamento adequados permitem o uso do GynTect® Kit e de todos os seus componentes até à data indicada. Nestas condições de armazenamento, o prazo de validade preferente refere-se aos reagentes GynTect® abertos.



Figura 1 Vigilância da temperatura de transporte

O ponto de medição de temperatura do GynTect® Kit permite a vigilância da temperatura durante o transporte. O quadrado prateado brilhante no centro do ponto indica que a temperatura durante o transporte não excedeu a temperatura de transporte permitida. Pelo contrário, o quadrado preto indica que a temperatura permitida foi excedida durante o transporte. O desempenho do GynTect® Kit não pode ser garantido. Neste caso por favor contate oncnostics GmbH.

ÍNDICE

1.	Finalidade prevista	5
2.	Significado clínico	5
3.	Princípio do método de ensaio	5
4.	Design do ensaio GynTect®	7
4.1.	Plano das GynTect® Strips	7
4.2.	Controlos	7
4.2.1.	Controlo de Qualidade ao Tratamento com Bissulfito (ACHE)	7
4.2.2.	Controlo de Qualidade à Metilação (IDS-M)	8
4.2.3.	Controlo positivo.....	8
4.2.4.	Controlo negativo	8
5.	Material de referência	8
6.	Conteúdo do kit	8
7.	Consumíveis e equipamento (não incluídos no kit).....	9
8.	Armazenamento e tempo de vida em prateleira	10
9.	Instruções de segurança.....	10
9.1.	Informações gerais.....	10
9.2.	Divisão espacial.....	11
9.3.	Prevenção da contaminação	12
9.4.	Instruções para o manuseamento	12
10.	Eliminação	12
11.	Procedimento GynTect®.....	13
11.1.	Cronograma para o fluxo de trabalho	13
11.2.	Amostragem.....	13

11.3.	Preparação das amostras	14
11.4.	Tratamento das amostras com bissulfito	14
11.4.1.	Conversão do ADN com bissulfito	14
11.4.2.	Purificação do ADN convertido	16
11.5.	PCR	17
11.5.1.	Preparação e pipetagem da PCR	17
11.5.2.	Realização da PCR com o cobas z 480 Analyzer	19
11.5.3.	Realização da PCR com o CFX96 Real-Time PCR Detection System	22
11.6.	Avaliação e interpretação dos dados da PCR.....	25
12.	Desempenho de GynTect®	28
12.1.	Desempenho analítico	28
12.1.1.	Sensibilidade analítica – deteção de ADN metilado	28
12.1.2.	Especificidade analítica – deteção de ADN não metilado	29
12.2.	Precisão	30
12.2.1.	Replicabilidade.....	30
12.2.2.	Reprodutibilidade	30
12.3.	Robustez.....	30
12.4.	Desempenho clínico.....	31
13.	Limitações do método	32
14.	Referências	32
15.	Responsabilidade	33
16.	Questões e problemas	33
17.	Notas adicionais.....	34
18.	Significado dos símbolos.....	34
19.	Lista de alterações	35
20.	Procedimento resumido.....	35

1. FINALIDADE PREVISTA

GynTect® é um kit de diagnóstico *in vitro* para a detecção qualitativa de seis indicadores epigenéticos em ADN bissulfito-convertido de amostras cervicais de mulheres com um resultado positivo no teste HPV ou um resultado pouco claro no teste Papanicolaou. Um resultado positivo no teste GynTect® correlaciona-se com a presença de uma neoplasia intraepitelial cervical ou de um carcinoma cervical.

GynTect® está apenas indicado para a utilização por pessoal qualificado e familiarizado com técnicas de biologia molecular.

2. SIGNIFICADO CLÍNICO

O cancro do colo do útero é, a nível mundial, o 4º cancro mais comum nas mulheres, com >600.000 novos casos diagnosticados por ano [1]. Em quase todos os casos de cancro do colo do útero, observou-se infeção persistente com papilomavirus humano de alto risco [2], demonstrando que a infeção com HPV é um pré-requisito para a carcinogénese cervical. Mulheres testadas negativamente para o HPV têm um risco extremamente baixo de desenvolver cancro do colo do útero. No entanto, a maior parte das mulheres testadas positivamente para o HPV também não desenvolvem lesões pré-cancerígenas ou cancro. Apenas ca. 15% das mulheres infetadas com HPV podem desenvolver esse tipo de lesão cervical pré-cancerígena [3].

Às pacientes testadas positivamente para o HPV ou com resultado do Teste de Papanicolau (Pap II, Pap III e Pap IIID1 e D2) inconclusivo pode ser recomendado fazer um teste de triagem como o GynTect®, que permita estimar a probabilidade de prevalência de doença cancerígena cervical que requer tratamento.

Os resultados GynTect® não devem ser usados para a decisão terapêutica final, deve ser avaliado em combinação com outras observações clínicas.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

GynTect® baseia-se na detecção de biomarcadores epigenéticos, mais precisamente metilações de regiões do ADN específicas correlacionadas com a existência de lesões pré-cancerígenas ou carcinomas cervicais [4, 5, 6]. Adicionalmente, analisa-se um marcador específico para o bissulfito, bem como um marcador específico para a metilação. As regiões dos marcadores aplicadas em GynTect® estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 Vista geral das regiões dos marcadores GynTect®

Designação no protocolo	Região do marcador (nome do gene)
Marcador de metilação	ASTN1
	DLX1
	ITGA4
	RXFP3
	SOX17
	ZNF671
Marcador de controlo	ACHE
	IDS

A deteção dos marcadores é realizada por Real-Time PCR de elevada sensibilidade. Os outputs dos instrumentos de Real-Time são o valor Cp (Cross point, cobas z 480 Analyzer) ou valor Cq (Cycle quantification, CFX96 Real-Time PCR Detection System), ambos correspondendo ao valor Ct de patamar dos ciclos e ambos são também referenciados como tal abaixo. Este valor corresponde ao ciclo num Real-Time PCR, no qual a fluorescência suba pela primeira vez acima de um determinado patamar.

A análise de uma amostra de paciente com GynTect® consiste em dois passos.

Em primeiro lugar, o ADN do esfregaço de colo do útero é tratado com uma reação química com bissulfito, levando à "fixação" da metilação do ADN. Para a purificação posterior à conversão com bissulfito recomendamos um procedimento mais simples e simplificado. Após a eluição, o ADN é diluído em água. No segundo passo, o ADN tratado com bissulfito é analisado por oito reações Real-Time PCR singleplex específicas para a metilação. As regiões de ADN metiladas originalmente são amplificadas seletivamente usando os primers colocados nos tubos de uma tira de PCR de oito tubos.

A deteção do marcador de metilação e das regiões de controlo em real-time é efetuada utilizando um corante fluorocromo intercalante. Adicionalmente, um controlo positivo e um controlo negativo são realizados para controlo da PCR. Subsequentemente, realiza-se a análise específica do ensaio.

A amostragem e o kit de bissulfito não fazem parte do GynTect® Kit. Produtos especiais para amostragem e tratamento com bissulfito estão disponíveis separadamente.

O princípio do teste está representado na Figura 2.

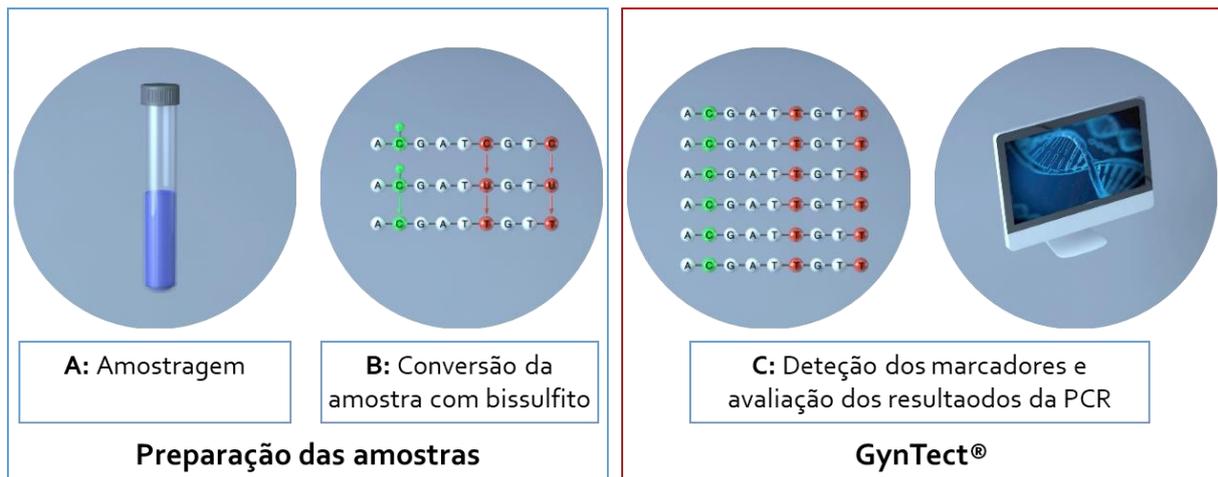


Figura 2 Princípio do teste

A: O ginecologista colhe um esfregaço do cervix uterino da paciente, que é transferido para um meio de amostragem.

B: O laboratório de diagnóstico realiza a conversão com bissulfito da amostra da paciente.

C: Para cada amostra, oito reações PCR singleplex são realizadas. A avaliação é conseguida pela deteção de corantes fluorescentes intercalados contidos na mastermix e pelos picos das curvas de fusão definidas.

4. DESIGN DO ENSAIO GYNTECT®

4.1. Plano das GynTect® Strips

Cada GynTect® Strip contém oito pares de primers para a amplificação de seis marcadores de metilação específicos e dois marcadores controlo. O esquema das GynTect® Strips está apresentado na Figura 3.

É necessária uma GynTect® Strip completa para a análise de uma única amostra de paciente.



Figura 3 Plano das GynTect® Strips

Cada posição 1 - 6 das tiras de PCR contém o primer para um de 6 marcadores específicos da metilação. A posição 7 contém os primers para o controlo de qualidade do bissulfito (ACHE), a posição 8 contém os primers para o controlo de qualidade da metilação (IDS-M).

4.2. Controlos

O design do kit GynTect® Kit inclui vários controlos. Estes controlos permitem a monitorização dos passos críticos do teste, incluindo a qualidade da amostra e o tratamento com bissulfito (ACHE), o estado de metilação da amostra (IDS-M) e a qualidade das reações de PCR.

4.2.1. Controlo de Qualidade ao Tratamento com Bissulfito (ACHE)

Este marcador de controlo verifica o sucesso da conversão de todos os resíduos de Citosina não metilada para Uracilo e conseqüentemente a qualidade do tratamento com bissulfito. Com este objetivo amplifica-se uma região do ADN localizada na acetilcolinesterase humana (ACHE). A amplificação inadequada da ACHE indica que o ensaio é inválido e deve ser repetido.

4.2.2. Controlo de Qualidade à Metilação (IDS-M)

Este controlo permite a amplificação do gene impresso IDS, que está metilado no segundo cromossoma X feminino (IDS-M). Se na reação PCR se obtém um valor Cp entre 20 e 32, a amostra cervical é válida. Se não houver amplificação, o ensaio tem de ser considerado inválido e deve ser repetido.

4.2.3. Controlo positivo

Um ADN-molde é fornecido para monitorização da qualidade da reação de PCR. Durante a amplificação do molde do GynTect® Positive Control (PC) para cada um dos oito marcadores deve obter-se um valor Cp abaixo de 38. De outro modo, as reações PCR são inválidas e devem ser repetidas.

4.2.4. Controlo negativo

Como controlo negativo realizam-se reações PCR com GynTect® Water (NTC – Controlo Sem Molde). Estas reações devem ser negativas para todos os marcadores. Se surgirem produtos de reação específicos em qualquer das reações, poderão ter ocorrido contaminações e GynTect® deve ser repetido.

5. MATERIAL DE REFERÊNCIA

Não está disponível material de referência internacional.

6. CONTEÚDO DO KIT

Tabela 2 Conteúdo do GynTect® Kit

Componente	Símbolo	Conteúdo	Volume / Quantidade	
			GT003-06	GT003-10
GynTect® Mastermix	PCR-MM	2 x PCR mastermix ¹	1 x 1.1 ml	1 x 1.1 ml
GynTect® Strips	STRIPS	Tiras PCR ² para amostras de pacientes (tampas verdes)	6 tiras	10 tiras
		Tiras PCR ² para os controlos positivos (tampas vermelhas)	3 tiras	1 tira
		Tiras PCR ² para os controlos negativos (tampas amarelas)	3 tiras	1 tira
GynTect® Caps	CAPS	Tiras de tampas de PCR	12 tiras de tampas	12 tiras de tampas
GynTect® Positive Control	CONTROL+	Controlo positivo	1 x 260 µl	1 x 90 µl
GynTect® Water	H₂O	Água	1 x 2 ml	1 x 2 ml
Instruções de utilização	-	Instruções de utilização	1	1

¹ Contém todos os componentes necessários para a Polymerase chain reaction (PCR), exceto o primer e o template.

² Contém os primers necessários para a PCR.

7. CONSUMÍVEIS E EQUIPAMENTO (NÃO INCLUÍDOS NO KIT)

GynTect® só pode ser conduzido utilizando o material e o equipamento descrito em seguida, e apenas por pessoal qualificado. Todo o equipamento laboratorial deve ser instalado, mantido, manuseado e calibrado de acordo com as instruções do fabricante.

Define-se temperatura ambiente (RT) como temperatura entre 15 °C e 30 °C.

Tabela 3 Equipamento necessário

Equipamento	Nº Catálogo	Encomenda
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) *	Z102	order@oncgnostics.com
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	-	via Hologic Inc.
Cervex-Brush® ou Cervex-Brush® Combi	-	via Rovers Medical Devices

* O EpiTect® **Fast** Bisulfite Kit (catálogo n.º QIAGEN: 59802) não deve ser confundido com o EpiTect® Bisulfite Kit!

O equipamento de laboratório e os consumíveis listados em seguida são necessários para realizar o ensaio GynTect®.

- Centrífuga para tubos de reação de 0,5 ml/1,5 ml, ≥ 10.000 xg
- Centrífuga para tiras de PCR
- Termociclador para tubos de reação de 0,5 ml
- Vortex / agitador
- Pipetas com gamas de volume diferentes e associadas a pontas com filtro (estéreis, DNase-free)
- Tubos de reação para 0,5 ml/1,5 ml (DNase-free)
- Suporte para tubos de reação 0,5 ml/1,5 ml
- Etanol 96 – 100%, não desnaturado
- Aparelho Real-time PCR, canal de detecção para FAM/SYBRGreen

GynTect® Kit foi validado em:

- cobas z 480 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH) com bloco de 96 poços, adaptador para tiras de PCR e LightCycler® 480 SW UDF 2.0.0 (Service Pack 3), avaliação com versão 1.5.1.62
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) com CFX Maestro software versão 2.3
- CFX Opus 96 (Dx) Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) com CFX Maestro Software Versão 2.3

8. ARMAZENAMENTO E TEMPO DE VIDA EM PRATELEIRA

Quando é transportado e armazenado de forma correta, o GynTect® Kit e todos os seus componentes podem ser usados até à data indicada. Todos os reagentes contidos no kit são estáveis até à data de validade após abertura indicada, se forem armazenados sob as condições indicadas e protegidos da contaminação (ver Tabela 4).

Tabela 4 Temperatura de armazenamento para o GynTect® Kit e equipamento não incluído no kit

Equipamento	Temperatura de armazenamento
GynTect® Kit	2 °C a 8 °C
EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) exceto as	15 °C a 25 °C
Spin Columns, DNA Protect Buffer, Buffer BD	2 °C a 8 °C
ThinPrep® PreservCyt® Solution (20 ml)	15 °C a 30 °C
Cervex-Brush® or Cervex-Brush® Combi	15 °C a 30 °C

9. INSTRUÇÕES DE SEGURANÇA

9.1. Informações gerais

Durante o estabelecimento dos métodos modernos de biologia molecular, as instruções seguintes devem ser seguidas rigorosamente de forma a garantir a máxima segurança para o pessoal do laboratório e para obter resultados de elevada qualidade:

- Como há o envolvimento de processos de biologia molecular, tais como o tratamento com bissulfito, a amplificação e a deteção de AND, este kit destina-se apenas ao diagnóstico *in vitro* e só deve ser usado por pessoal treinado em práticas laboratoriais para o diagnóstico *in vitro*.
- Antes de usar o produto, leia as instruções atentamente. Só deve considerar a versão mais recente.
- Use em cada etapa uma bata adequada, luvas descartáveis e, se necessário, óculos de proteção.
- Evite o contato direto com as amostras biológicas, bem como respingar ou pulverizar as amostras.
- A tampa aquecida e o bloco de aquecimento do termociclador podem atingir temperaturas até aos 110 °C. Existe o risco de queimaduras. Por favor, tenha atenção às instruções operacionais do aparelho.
- Lave as mãos abundantemente após manuseamento de amostras e reagentes.
- Não utilize GynTect® se a embalagem dos reagentes estiver danificada. Contate o seu distribuidor.
- Não use o GynTect® Kit após a data de validade e não use reagentes expirados.

- Não misture reagentes de lotes diferentes e não misture reagentes com reagentes de outros fabricantes.
- Use apenas os materiais fornecidos com o kit ou recomendados pelo fabricante.
- Todo o equipamento de laboratório necessário deve ser instalado, calibrado, manuseado e mantido de acordo com as instruções do fabricante.
- Pipetar pequenos volumes de líquido na gama dos microlitros requer prática. Certifique-se de que pipeta os volumes necessários com as micropipetas da forma mais precisa possível.
- Tem de haver conformidade com os requisitos legais aplicáveis para o operador.
- Pressupõe-se a adesão às Boas Práticas de Laboratório (BPL) conforme delineado, por exemplo, pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) ou pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Especificamente, devem considerar-se as recomendações para a realização de testes de amplificação molecular.
- O funcionamento adequado dos aparelhos de PCR só é garantido à temperatura ambiente.

9.2. Divisão espacial

Devido à elevada sensibilidade analítica da PCR, deve prestar-se especial atenção à manutenção da pureza dos componentes do kit e amostras.

PCR multiplica secções da amostra de ADN milhões a biliões de vezes. Até as quantidades mais pequenas destes produtos de PCR (ex. também espalhadas como aerossol) podem originar resultados falsos, se forem transpostas para o mesmo material de amostra, para os reagentes, para o tratamento com bissulfito ou para os reagentes de PCR deste kit.

Um fluxo de trabalho limpo e bem estruturado é então crucial para prevenir resultados incorretos. Para este fim, é necessário separar as áreas do laboratório para pré-PCR e pós-PCR uma da outra. Equipamentos, consumíveis, batas e luvas independentes devem estar disponíveis em cada área. Nunca transfira batas, luvas ou equipamento de uma área para a outra. A Figura 4 mostra um exemplo de um laboratório dividido em duas salas independentes. Uma área está designada apenas ao tratamento com bissulfito e à preparação da PCR, enquanto na outra área se realiza a PCR.

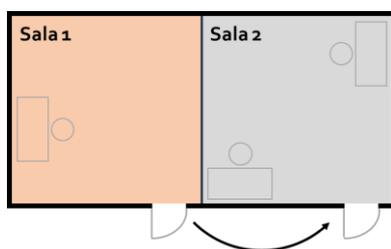


Figura 4 Divisão espacial

Na sala 1 realizam-se o tratamento com bissulfito e a preparação da PCR (ideal: use uma câmara de PCR). Na sala 2 realiza-se a série de PCT, a deteção dos marcadores e analisam-se os resultados.

9.3. Prevenção da contaminação

- Batas e luvas têm de ser usadas durante todas as etapas.
- As luvas descartáveis devem ser trocadas frequentemente e sempre após (suspeita de) contaminação com reagentes ou material de amostra.
- Todas as superfícies, equipamento e materiais devem ser descontaminados com uma solução de limpeza adequada (agentes destruidores de ADN).
- Não toque no interior dos tubos de reação nem nas suas tampas.
- Tem de usar-se sempre pontas com filtro adequadas para pipetar (sem DNase, RNase nem ADN humano) para excluir contaminação cruzada via aerossóis gerados durante a pipetagem. As pontas devem ser sempre mudadas entre etapas de pipetagem.
- É importante realizar controlos negativos para detetar possível contaminação.

9.4. Instruções para o manuseamento

- Armazene os componentes não usados na embalagem original até os usar.
- Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente.
- O fluxo de trabalho pode ser interrompido depois do tratamento com bissulfito. Neste ponto, as amostras podem ser armazenadas até uma semana entre 2 °C e 8 °C ou até dois meses a -15 °C a -30 °C.
- Nunca toque no interior das tampas coloridas das tiras de PCR quando as remover das tiras, e elimine-as de forma profissional.
- As GynTect® Strips e GynTect® Caps não devem ser tocadas sem luvas descartáveis durante todo o procedimento, caso contrário podem surgir sinais de fluorescência não específica.
- A identificação das GynTect® Strips e das GynTect® Caps em posições inadequadas pode resultar em sinais de fluorescência não específica durante as séries de PCR.
- As GynTect® Strips e GynTect® Caps estão destinadas a utilização única e não devem ser reutilizadas.
- Guarde as GynTect® Strips e GynTect® Caps não usadas na sua embalagem original.

10. ELIMINAÇÃO

O GynTect® Kit e os seus componentes podem ser eliminados sem precauções especiais. Amostras de pacientes e tubos de reação devem ser tratados como material infeccioso. Todos os reagentes têm de ser eliminados de acordo com a regulamentação legal.

11. PROCEDIMENTO GYNTECT®

O capítulo seguinte contém a descrição detalhada dos vários passos de processamento, desde a colheita das amostras até à análise dos dados. O Kit GynTect® GToo3-10 contém um controlo positivo e um negativo para cada série de GynTect®. As dez amostras têm de ser usadas num único fluxo de trabalho.

11.1. Cronograma para o fluxo de trabalho

No conjunto, GynTect® pode ser processado em menos de 4 horas com o manuseamento ativo a requerer cerca de 2 horas. Antes de conduzir o primeiro ensaio GynTect®, deve reservar aprox. 15 minutos para estabelecer um programa modelo de PCR para o ensaio.

A Figura 5 mostra os detalhes do fluxo de trabalho.

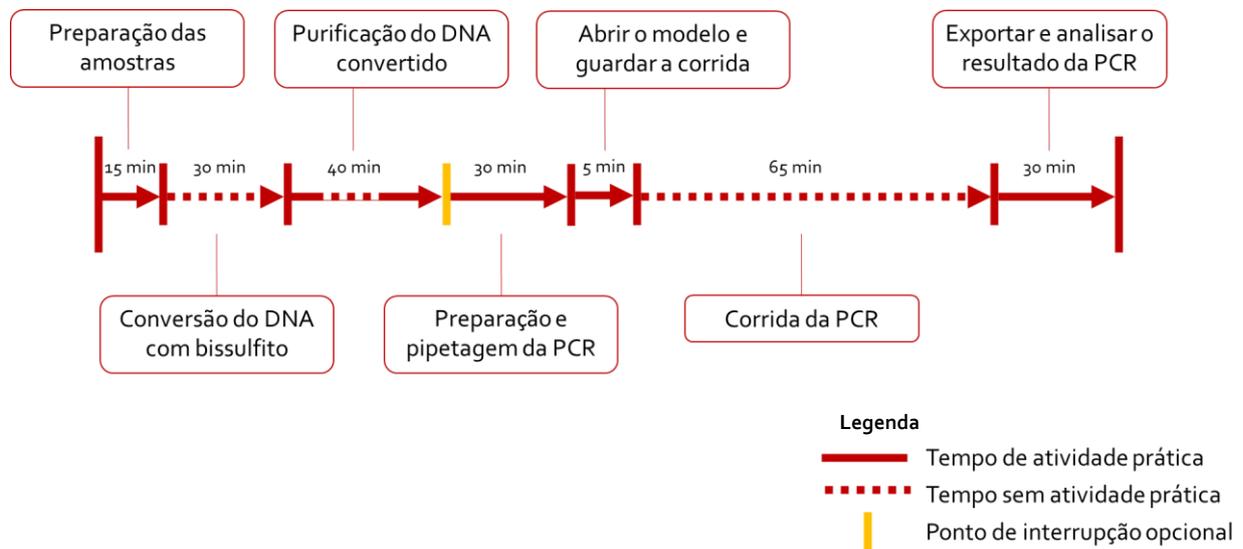


Figura 5 Cronograma para o fluxo de trabalho GynTect®

11.2. Amostragem

O kit de amostragem e o kit de bissulfito não fazem parte do Kit GynTect®. O frasco ThinPrep® PreservCyt® Solution (Hologic) e a escova Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices) podem ser adquiridos dos respetivos fabricantes. A colheita de uma amostra cervical pelo médico deve ser realizada de acordo com as instruções do fabricante e em conformidade com as orientações aceites geralmente para a colheita de uma amostra de esfregaço do colo do útero [7].

Importante: A escova deve ser eliminada após a amostragem e não deve ficar no meio de cultura, caso contrário vai afetar o desempenho de GynTect®.

A Solução ThinPrep® PreservCyt® deve ser usada como o meio do esfregaço. O uso de outros meios de amostragem não fez parte da validação do ensaio GynTect®.

Garantir a boa qualidade do ADN empregue na amostra é um pré-requisito importante para a validade do ensaio. Amostragem, tratamento com bissulfito e armazenagem de ADN inadequados podem levar a resultados falsos negativos.

As amostras cervicais podem ser transportadas até ao laboratório de teste sem refrigeração. As amostras podem ser guardadas até 1,5 anos a uma temperatura de 2 °C a 30 °C.

11.3. Preparação das amostras

As etapas seguintes devem ser conduzidas na área de preparação da amostra (Sala 1).

Importante: Se a escova ainda estiver no frasco de amostragem, tem de ser eliminada antes do processamento da amostra.

1. Agite a amostra do paciente durante 5 seg. à velocidade máxima e transfira imediatamente 1 ml da amostra para um tubo de 1,5 ml.

Atenção: As células vão estabelecer-se no fundo do frasco muito rapidamente. A amostra do paciente tem de ser usada durante os 10 seg. após mistura.

2. Centrifugue a amostra durante 5 min a 10.000 xg.
3. Com cuidado, remova 900 µl do sobrenadante que está acima do pellet. Não retire nem destrua o pellet.

Atenção: Dependendo da amostra, o pellet pode estar mais ou menos fixo.

4. Agite o pellet durante 3 seg. para ressuspendê-lo. Usam-se 40 µl da amostra ressuspendida para o tratamento com bissulfito.

11.4. Tratamento das amostras com bissulfito

O kit de bissulfito não faz parte do GynTect® Kit. GynTect® foi validado usando o EpiTect® Fast Bisulfite Kit (10) (Qiagen).

Atenção: O procedimento original do Kit EpiTect® Fast Bisulfite (10) (Qiagen) foi modificado. A utilização deste procedimento modificado é um pré-requisito para concretizar os parâmetros de desempenho indicados.

11.4.1. Conversão do ADN com bissulfito

1. Prepare os tampões do kit de bissulfito para serem usados de acordo com a Tabela 5.

Importante: O **Buffer BL** é usado sem *Carrier RNA*. Quando o **Buffer BL** é armazenado ou transportado a temperaturas baixas podem formar-se precipitados. Neste caso, resolva a precipitação com ligeiro aquecimento (37 °C) e agitando o **Buffer BL**.

Tabela 5 Tampões para EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Tampão	Adição de Etanol	Temperatura de armazenamento
Buffer BL *	-	Temperatura ambiente
Buffer BW	30 ml Etanol (96 - 100 %)	Temperatura ambiente
Buffer BD	27 ml Etanol (96 - 100 %)	2 °C a 8 °C

* Não adicione *Carrier RNA*, controlo de qualidade (ver nota)

2. Para cada amostra, monte uma mistura de reação para o tratamento com bissulfito usando tubos de 0,5 ml de acordo com a Tabela 6.

Importante: Quando a **Bisulfite Solution** é armazenada ou transportada a temperaturas baixas podem formar-se precipitados. Neste caso, resolva a precipitação com ligeiro aquecimento (37 °C) e agitando a **Bisulfite Solution**.

Tabela 6 Set-up para o tratamento com bissulfito

Composto	Por reação
Bissulfite Solution *	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Amostra preparada & ressuspensa	40 µl
Volume total por reação	140 µl

* controlo de qualidade (ver nota)

Atenção: A **Bissulfite Solution** não pode ser armazenada. Uma **Bissulfite Solution** só pode ser usada para um processo, os sobrantes têm de ser eliminados.

3. Agite a mistura de reação para a conversão com bissulfito durante 3 seg. à velocidade máxima, centrifugue-a brevemente e deixe à temperatura ambiente até utilização subsequente.

Atenção: O **DNA Protect Buffer** muda de cor de verde para azul, se o pH da mistura estiver na gama correta. A amostra tem de ser processada dentro de 60 min.

4. Use um termociclador com tampa aquecida (100 °C) e programe o ciclador de acordo com a Tabela 7.

Importante: Se o termociclador não aceitar um volume tão elevado como 140 µl utilize o próximo volume possível. A tampa não tem de ser pré-aquecida antes do início da conversão.

Tabela 7 Conversão com Bissulfito usando um termociclador

Etapa	Duração	Temperatura
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	10 min	60 °C
Desnaturação	5 min	95 °C
Incubação	10 min	60 °C
Final da reação	Manter*	20 °C

* O ADN convertido pode ficar no termociclador ou ser armazenado à temperatura ambiente durante a noite (máx. 16 horas).

5. Coloque os tubos de 0.5 ml no bloco de aquecimento do termociclador e inicie a incubação.

Atenção: Após a conversão com bissulfito, as amostras podem ser armazenadas overnight (máx. 16 horas) à temperatura ambiente. Evite armazenamento refrigerado (a temperaturas de 2 °C a 8 °C), uma vez que as amostras podem precipitar, impedindo o processamento subsequente.

11.4.2. Purificação do ADN convertido

6. Após completar a conversão com bissulfito, agite o tubo PCT durante 3 seg. à velocidade máxima e centrifugue brevemente para remover gotas do interior da tampa.

7. Adicione **310 µl Buffer BL** a cada MinElute® Spin Column.

Importante: Identifique a MinElute® Spin Column de forma evidente.

8. Adicione a amostra (140 µl) à coluna de spin e misture brevemente, pipetando 5 x para cima e para baixo.

Importante: Não toque na membrana da coluna com a ponta da pipeta e evite a formação de bolhas. Garanta que a solução é homogênea e livre de estrias após pipetar 5x para cima e para baixo.

9. Adicione **250 µl Etanol** (96 - 100 %) a cada coluna de spin, feche a tampa e misture brevemente 5x por inversão do pivot da coluna (180°).

10. Centrifugue cada coluna de spin durante 30 seg. a 18.000 xg e garanta que o líquido atravessou a coluna para dentro do collection tube.

11. Retire a coluna de spin da centrífuga, elimine o escoamento e coloque a coluna de spin novamente no collection tube.

12. Para lavar, adicione **200 µl Buffer BW** à coluna de spin e centrifugue durante 30 seg. a 18.000 xg.

13. Adicione **200 µl Buffer BD** a cada coluna de spin, feche a tampa e incube 15 min à temperatura ambiente (15 - 30 °C).

14. Após terminar a dessulfonação, centrifugue a coluna de spin durante 30 seg. a 18.000 xg.

15. Adicione **200 µl Buffer BW** e centrifugue durante 30 seg. a 18.000 xg.

16. Retire a coluna de spin da centrífuga, elimine o escoamento e coloque a coluna de spin novamente no collection tube.

17. Lave a coluna de spin com **400 µl Buffer BW** e centrifugue durante 30 seg. a 18.000 xg.

18. Adicione **200 µl Etanol** (96 - 100 %) a cada coluna de spin e centrifugue durante 30 seg. a 18.000 xg.

19. Coloque a coluna de spin num novo collection tube de 2 ml e centrifugue durante 60 seg. a 18.000 xg para remover qualquer líquido residual.

Atenção: Não salte esta etapa, uma vez que o etanol residual pode condicionar o desempenho do ensaio GynTect®.

20. Coloque a coluna de spin num tubo de 1.5 ml tubo limpo (não fornecido), adicione 20 µl de água diretamente no centro da membrana da coluna de spin e feche a tampa gentilmente.

Importante: Não danifique a membrana da coluna de spin e não pipeta a água na lateral da coluna de spin.

21. Incube a coluna de spin à temperatura ambiente durante 60 seg. e a seguir centrifugue a coluna de spin durante 60 seg. a 8.000 xg (eluição).

22. Verifique visualmente se o eluato tem o volume correto.

Opcional: Neste ponto as amostras podem ser conservadas até uma semana a 2 °C a 8 °C ou até 2 meses a - 15 °C a - 30 °C.

11.5. PCR

Antes de iniciar a PCR, garanta que o protocolo de temperaturas da PCR está programado no aparelho Real-Time PCR, de forma a minimizar o tempo entre a preparação e o início da PCR. Para estabelecer o programa da PCR no cobas z 480 Analyzer, prossiga como descrito na página 19. A explicação para PCR no CFX96 Real-Time PCR Detection System pode ser encontrada a partir da página 22.

11.5.1. Preparação e pipetagem da PCR

Importante: A preparação e a pipetagem das reações de PCR não deve demorar mais de 60 minutos. Esta etapa decorre na Sala 1 (área pré-PCR).

Por favor, note o esquema de placas descrito nas páginas 19 ou 22, respetivamente. O Controlo Positivo (PC) tem de estar posicionado na linha 11 e o Controlo Negativo (NTC) na linha 12.

1. Adicione **70 µl GynTect® Water** a cada amostra.
2. Agite as amostras durante 3 seg. à velocidade máxima e centrifugue-as brevemente.
3. Retire a **GynTect® Mastermix** do kit e use para cada amostra uma **GynTect® Strip** (tampa verde) e para cada controlo uma **GynTect® Strip** (controlo positivo: tampa vermelha, controlo negativo: tampa amarela).
4. Coloque as **GynTect® Strips** num suporte para PCR. Por favor, esteja ciente da orientação das **GynTect® Strips** (ver Figura 6).

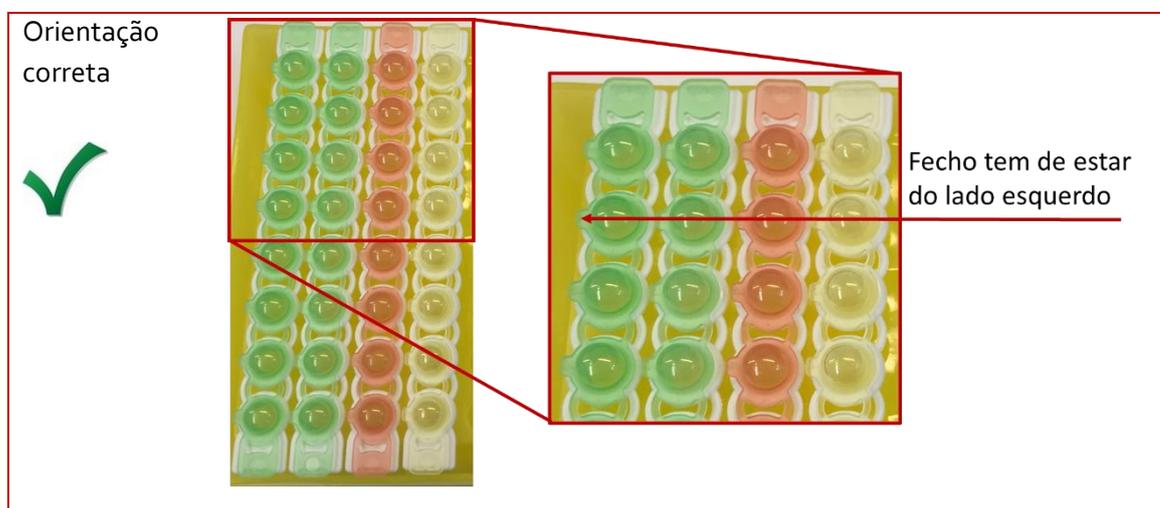


Figura 6 Orientação das GynTect® Strips

5. Agite a **GynTect® Mastermix** 3 seg. à velocidade máxima e centrifugue brevemente.
6. Retire as tiras coloridas e redondas da **GynTect® Strip** e elimine-as.
7. Adicione **10 µl** da **GynTect® Mastermix** a cada tubo da **GynTect® Strip**.

Nota: Observa-se uma coloração azul. Esta serve para inspeção visual e não tem influência no resultado GynTect®.

Importante: Mude de pontas para cada tubo da tira, uma vez que as **GynTect® Strips** já contêm os primers para a PCR.

8. Adicione **10 µl de amostra** a cada um dos oito poços das **GynTect® Strips**.

Importante: Mude de ponta para cada tubo da tira.

Nota: Guarde o resto dos eluatos das amostras para a repetição da PCR **GynTect®**, caso seja necessário.

9. Feche as **GynTect® Strips** com as **GynTect® Caps** lisas transparentes imediatamente após pipetar.

Atenção: Evite tocar no interior das **GynTect® Caps** e das **GynTect® Strips**. Garanta que as **GynTect® Strips** estão bem fechadas. A inspeção visual efetua-se mais facilmente pelo lado.

10. Agite o **GynTect® Positive Control** durante 3 seg. à velocidade máxima e centrifugue-o.

11. Adicione a cada um dos oito poços da **GynTect® Strip** **10 µl** do **GynTect® Positive Control** e a cada um dos oito poços da **GynTect® Strip** para o controlo negativo **10 µl** de **GynTect® Water**.

12. Feche as **GynTect® Strips** com as **GynTect® Caps** lisas transparentes imediatamente após pipetar.

Atenção: Evite tocar no interior das **GynTect® Caps** e das **GynTect® Strips**. Garanta que as **GynTect® Strips** estão bem fechadas. A inspeção visual efetua-se mais facilmente pelo lado.

13. Assim que terminar de pipetar, identifique todas as **GynTect® Strips** nas abas das novas **GynTect® Caps** (ver Figura 7).

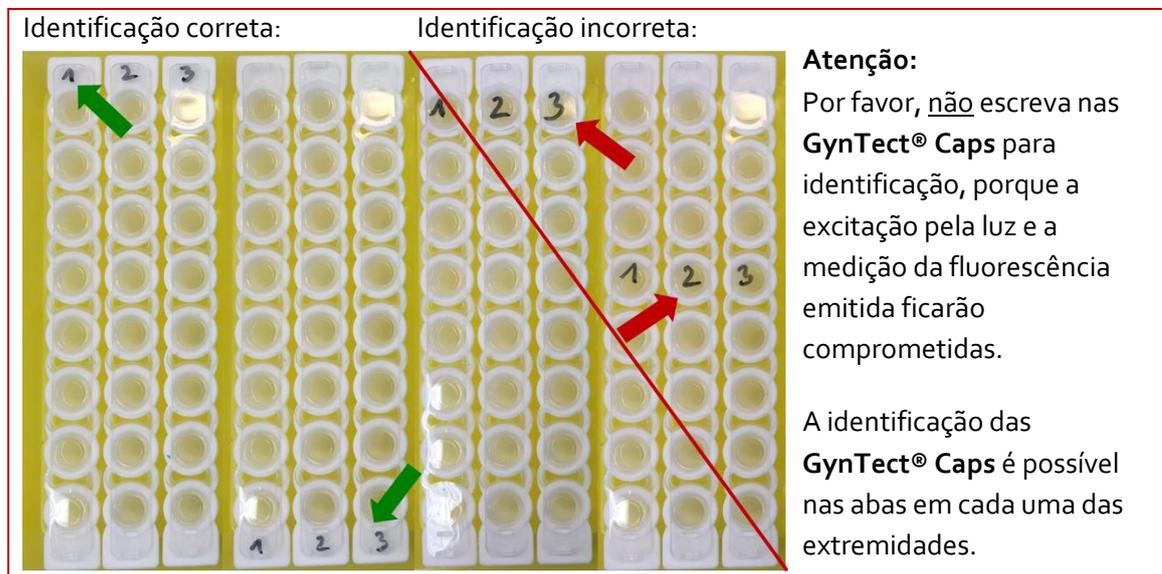


Figura 7 Identificação das **GynTect® Strips**

14. Agite todas as **GynTect® Strips** fechadas durante 3 seg. à velocidade máxima e centrifugue-as brevemente.

11.5.2. Realização da PCR com o cobas z 480 Analyzer

A secção seguinte delinea como realizar o GynTect® no sistema Real-Time PCR cobas z 480 Analyzer (marcado a azul) e no CFX96 Real-Time PCR Detection System (marcado a verde). Contudo, siga sempre as instruções do fabricante para a utilização de aparelhos de PCR.

A PCR deve ser realizada na Sala 2.

11.5.2.1. Criação de um modelo de PCR

Se criou e gravou o modelo de PCR anteriormente, prossiga para 11.5.2.2 *Inicialização da série de PCR*.

1. Ligue o cobas z 480 Analyzer e o seu computador. Em menos de 15 seg., selecione "User defined Workflow" no ecrã do computador na BIOS, de modo a alternar para o modo de programação livre do aparelho.
2. Para criar um modelo novo, selecione *New Experiment*.

No separador *Run Protocol*, defina o *Detection Format* como SYBR Green 1 / HRM Dye e defina o *Reaction Volume* para 20 µl. Programe o protocolo de temperaturas em conformidade Tabela 8.

Tabela 8 Protocolo de temperaturas de PCR para o 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 o *Run-Template* com o nome *GynTect*.

11.5.2.2. Inicialização da série de PCR

Se gravou o modelo de PCR previamente, pode aceder agora. Verifique que está definido o protocolo de temperaturas correto.

1. Em *Subset Editor*, gere o esquema de placa recomendado (ver Figura 8 e Figura 9).

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

Figura 8 Exemplo de um plano de placa para seis amostras

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

Figura 9 Exemplo de um plano de placa para dez amostras usando GToo3-10

Importante: O esquema de placa **não é** variável. O controlo positivo (PC) tem de ser colocado na linha 11 e o controlo negativo (NTC) na linha 12.

- Defina a identificação das amostras em *Sample Editor*.
- Coloque as tiras verticalmente no aparelho de PCR, na ordem correspondente.

Importante: Utilize o adaptador para tiras de PCR (encomendado através da Roche Diagnostics GmbH).

- Guarde a série de PCR na localização desejada com um nome inequívoco clicando em *disk-button* e inicie a série de PCR clicando em *Start Run* no separador *Run Protocol*.

11.5.2.3. Exportação dos dados

Se estiver a analisar a série de PCR diretamente no computador do cobas z 480 Analyzer, por favor siga para 11.5.2.4 *Definições de avaliação no software do aparelho*.

Depois de completar a série da PCR (Run complete), exporte a corrida de PCR via  "Export" e guarde o ficheiro na localização desejada.

11.5.2.4. Definições de avaliação no software do aparelho

Se exportou a série de PCR, inicie o software LightCycler® 480 noutro computador e abra/importe a série de PCR. Caso contrário, realize a análise no computador do cobas z 480 Analyzer.

1. Selecione o algoritmo *Abs Quant/Fit Points* em *Analysis Editor* e o Subset possível definido.
2. Defina *Background* entre 5 e 20 no separador *Cycle Range*, adicionalmente escolha *Min Offset* 4 e *Max Offset* 19. Garanta a definição dos *First Cycle* e *Last Cycle*, a *Cycle Range* deve incluir 1 a 42.
3. No separador *Noise Band* garanta que *STD Multiplier* está definido para 12 e *Noise Band* é calculada automaticamente.
4. No separador *Analysis Threshold* defina para 0,5 e verifique que o número de *Fit Points* está ajustado para 2.
5. Seguidamente verifique todas as definições clicando no botão *Calculate* e realize a análise. Exporte a tabela de dados via *Export Table* clicando no botão direito do rato e guarde como ficheiro .txt na localização desejada com um nome inequívoco.
6. Regresse a *Analysis Editor* e selecione o algoritmo *Tm Calling* no *Analysis Editor* e o Subset possível definido.
7. Selecione também a caixa de seleção *Height* ao lado de *Tm* e confirme todas as definições clicando em *Calculate* e realize a análise. Exporte a tabela de dados via *Export Table* clicando no botão direito do rato e guarde como ficheiro .txt na localização desejada com um nome inequívoco.

O capítulo 11.6 descreve a análise e interpretação dos dados da PCR.

11.5.3. Realização da PCR com o CFX96 Real-Time PCR Detection System

Siga sempre as instruções do fabricante para a utilização de aparelhos de PCR.

A PCR deve ser realizada na Sala 2.

11.5.3.1. Criação de um modelo de PCR

1. Ligue o aparelho de PCR.
2. Programe o protocolo de temperaturas de PCR conforme descrito na Tabela 9, selecionando e editando as etapas e as durações de temperatura.

Tabela 9 Protocolo de temperaturas de PCR** para o 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

* O sinal de fluorescência é detetado através da "Plate Read" durante as etapas 3 e 6, o que está sinalizado pelo símbolo da câmara.

** No CFX96 Real-Time PCR Detection System, a rampa pré-definida é de 5 °C/seg. Esta definição foi usada para validar este teste IVD.

3. Defina o *Volume* para 20 µl e *Lid heater* a 105 °C.
4. Guarde o modelo de PCR com o nome *GynTect*.

11.5.3.2. Inicialização da série de PCR

Se gravou o modelo de PCR previamente, pode aceder agora. Verifique se está definido o protocolo de temperaturas correto.

1. Coloque as GynTect® Strips no interior do aparelho de PCR, inserindo-as verticalmente nos pequenos poços da placa de aquecimento. Selecione um esquema de placa adequado (ver Figura 10 e Figura 11).

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

Figura 10 Exemplo de um plano de placa para seis amostras

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

Figura 11 Exemplo de um plano de placa para dez amostras usando GT003-10

Importante: O esquema de placa **não é** variável. O controlo positivo (PC) tem de ser colocado na linha 11 e o controlo negativo (NTC) na linha 12.

2. Dê um nome à execução utilizando um nome de ficheiro adequado. Note-se que o SYBR/FAM é detectado antes de se iniciar a execução.

11.5.3.3. Exportação dos dados

Após completar a PCR, exporte a série de PCR (ficheiro .pcrd).

11.5.3.4. Definições de avaliação no software do aparelho

1. Abra o Bio-Rad CFX Software e em primeiro lugar defina *Plate Type: BR White* em *User → User Preferences → Plate* de forma a indicar que é usado plástico branco.
2. Importe o ficheiro .pcrd.
3. Defina o esquema de placa em *Plate Setup → View/Edit Plate*. Insira o nome em *Sample Names*. As posições desocupadas estarão marcadas e podem ser excluídas da análise, desseleccionando *Exclude Wells in Analysis*. Confirme o esquema da placa em *OK*.
4. Defina as definições de análise em *Settings* (ver Tabela 10).

Tabela 10 Definições de análise para o CFX96 Real-Time PCR Detection System

Parâmetro	Definição
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. Selecione *Load a Preset View* → *Amplification + Melt* no separador *Custom Data View*. Defina manualmente o patamar em *Melt Peak Chart* a “zero” (“drag-and drop”).
6. Selecione *Custom Export* no separador *Export* e estabeleça as seguintes definições:
 - Formato: Excel 2007 (*.xlsx)
 - Data to Export → selecione as caixas seguintes
(*Include Run Information Header, Well, Fluorophore, Target Name, Content, Sample Name, Cq, Melt Temperature Melt Peak Height*)

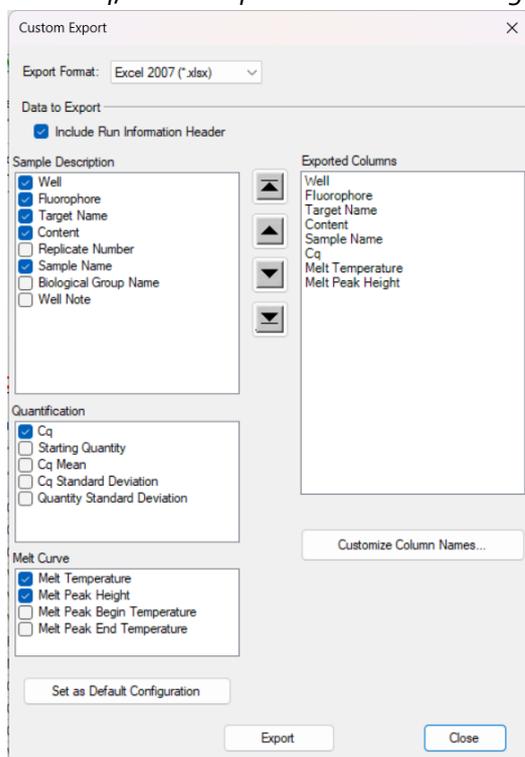


Figura 12 Custom Export

7. Pressione o botão *Export* e guarde o ficheiro .xlsx com um nome inequívoco.

11.6. Avaliação e interpretação dos dados da PCR

Segue-se a descrição da análise dos dados exportados.

1. Abra um programa de folha de cálculo apropriado e copie para o seu interior os dados de PCR exportados.
2. Formatar os dados de uma forma, por exemplo, que os resultados de cada amostra estejam escritos em coluna e que todas as amostras estejam escritas ao lado umas das outras.

Marcador	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5		Amostra 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		

Verificação da validade da série de PCR

3. A série de PCR é **válida**, se os controlos positivo e negativo cumprirem com os seguintes critérios (ver Tabela 11).

Tabela 11 Critérios de validade para os controlos de GynTect®

Marcador	Controlo Positivo			Controlo Negativo
	Valor Ct	Gama da temperatura de fusão (cobas)	Gama da temperatura de fusão (CFX)	Valor Ct
ASTN1	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 86 °C	78 °C - 86 °C	Nenhum valor*
DLX1	≥ 20, ≤ 38	79 °C - 85 °C	77 °C - 85 °C	Nenhum valor*
ITGA4	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	Nenhum valor*
RXFP3	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	Nenhum valor*
SOX17	≥ 20, ≤ 38	81 °C - 87 °C	79 °C - 87 °C	Nenhum valor*
ZNF671	≥ 20, ≤ 38	80 °C - 87 °C	78 °C - 87 °C	Nenhum valor*
ACHE	≥ 20, ≤ 38	78 °C - 83 °C	76 °C - 83 °C	Nenhum valor*
IDS-M	≥ 20, ≤ 38	78 °C - 88 °C	76 °C - 88 °C	Nenhum valor*

* **Cuidado:** Não deve obter nenhuns valores Ct para o Controlo Negativo. Se obtiver um valor Ct para qualquer um dos marcadores, não deverá mostrar uma curva de fusão específica para o marcador.

Verificação das validade e positividade das amostras

4. O resultado para a amostra de paciente é **válido**, se os marcadores de controlo ACHE e IDS-M cumprirem com os seguintes critérios (ver Tabela 12).

Tabela 12 Critérios de validade para os marcadores de controlo em amostras de pacientes

Marcador	Valor Ct	Gama da temperatura de fusão (cobas)	Gama da temperatura de fusão (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

- O resultado GynTect® para esta amostra é considerado **inválido**, se for gerado um valor $Ct > 0, < 20$ com uma temperatura de fusão no intervalo definido.
- Para amostras **válidas**, use a equação seguinte para calcular ΔCt para todos os marcadores específicos para a metilação detetados com valores Ct e temperaturas de fusão dentro das gamas definidas (ver Tabela 13).

Avaliação de ΔCt

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

Para cada amostra, os marcadores específicos para a metilação são classificados como **positivos**, se os ΔCt gerarem valores de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13 Critérios para a positividade de marcadores específicos de metilação em amostras de pacientes

Marcador	Valor Ct	Gama da temperatura de fusão (cobas)	Gama da temperatura de fusão (CFX)	ΔCt
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: Analise as curvas de amplificação e de fusão de acordo com os pontos de dados controversos e as características das curvas. As amostras com características das curvas controversas têm de ser classificadas como inválidas.

Avaliação do ensaio GynTect®

- Para a avaliação do ensaio GynTect® atribua os seguintes valores para os marcadores (ver Tabela 14) únicos positivos e some os valores para os seis marcadores:

Tabela 14 Valores para os marcadores GynTect®

Marcador	Valor, se o marcador for positivo	Valor, se o marcador for negativo
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Se a **soma** de todos os valores dos marcadores é **igual ou superior a 6**, o ensaio GynTect® para a amostra é **positivo**.

Se a **soma** de todos os valores dos marcadores é **igual ou inferior a 5**, o ensaio GynTect® para a amostra é **negativo**.

O resultado positivo do teste GynTect® está correlacionado com a presença de uma neoplasia intraepitelial cervical ou carcinoma cervical. O resultado de GynTect® não deve ser usado para a decisão terapêutica final, deve ser avaliado em combinação com outras observações clínicas.

12. DESEMPENHO DE GYNTECT®

Os dados de desempenho aqui apresentados foram colhidos no cobas z 480 Analyzer.

12.1. Desempenho analítico

12.1.1. Sensibilidade analítica – detecção de ADN metilado

A sensibilidade analítica do ensaio de PCR foi determinada usando amostras de ADN genómico humano metilado e convertido por bissulfito. Os limites de detecção correspondentes estão resumidos na Tabela 15. As séries de diluição foram testadas em três experiências independentes, cada uma em triplicado. Com raspagens normais, usaram-se 20 - 50 ng para o ensaio.

Tabela 15 Sensibilidade analítica do ensaio PCR – parte 1

Quantidade de ADN usada	Número de células no ensaio*	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

* uma célula contém aproximadamente 6 - 7 pg ADN genómico

O limite de detecção geral para o qual os marcadores de metilação são detectáveis em todas as reações, situa-se em 15 células (0,1 ng).

Adicionalmente, uma mistura de ADN consistindo de ADN genómico humano metilado e convertido por bissulfito e de ADN genómico humano não metilado e convertido por bissulfito foi testada em experiências similares. Em cada ensaio usaram-se respetivamente 100 ng ADN. As séries de diluição foram testadas em três experiências independentes, cada uma em triplicado (ver Tabela 16).

Tabela 16 Sensibilidade analítica do ensaio PCR – parte 2

Porcentagem de ADN metilado	Quantidade total de ADN	ASTN1 $\Delta C_p \leq 8$	DLX1 $\Delta C_p \leq 9$	ITGA4 $\Delta C_p \leq 9$	RXFP3 $\Delta C_p \leq 9$	SOX17 $\Delta C_p \leq 9$	ZNF671 $\Delta C_p \leq 10$
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

* Uma de nove amostras foi negativa para o marcador ACHE e tem de ser excluída.

O limite de detecção para dos marcadores de metilação foi determinado a 1% ADN metilado para uma amostra de 20 ng e a 10 % para uma amostra de 100 ng ADN por ensaio.

Os resultados de uma experiência spike-in com células SiHa em amostras de pacientes demonstrou que em amostras de pacientes com uma concentração de pelo menos 3×10^5 células por ml a fração de 0,1 % de células metiladas pode ser detetada com confiança.

12.1.2. Especificidade analítica – detecção de ADN não metilado

A especificidade analítica do ensaio de PCR foi determinada usando 10 - 12 kb de fragmentos de PCR longos, não metilados e convertidos com bissulfito, em representação do genoma humano completo. As experiências foram realizadas com determinação em fator de 5, e os resultados estão resumidos na Tabela 17. A validade das amostras foi garantida pelo Marcador ACHE. Nenhum resultado positivo do teste GynTect® foi obtido abaixo de uma concentração de 750 ng ADN não metilado, convertido com bissulfito (biADN).

Tabela 17 Especificidade analítica do ensaio de PCR

ADN utilizado	ASTN1 $C_p \leq 42$	DLX1 $C_p \leq 42$	ITGA4 $C_p \leq 42$	RXFP3 $C_p \leq 42$	SOX17 $C_p \leq 42$	ZNF671 $C_p \leq 42$
0 ng biADN não metilado	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
100 ng biADN não metilado	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5
250 ng biADN não metilado	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
500 ng biADN não metilado	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
750 ng biADN não metilado	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
75 ng gADN metilado	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

12.2. Precisão

12.2.1. Replicabilidade

24 amostras diferentes foram testadas três vezes com GynTect®. Em cada caso realizaram-se uma nova preparação das amostras e tratamento com bissulfito. As três experiências foram realizadas por uma pessoa, mas em dias distintos. 16 amostras mostraram resultados idênticos em 3 / 3 séries. Logo, 80 % das amostras podem ter uma replicabilidade de 100 % em três experiências.

12.2.2. Reprodutibilidade

20 amostras diferentes foram testadas três vezes com GynTect® em laboratórios independentes. Em cada caso realizaram-se uma nova preparação das amostras e um tratamento com bissulfito, bem como foram usados aparelhos PCR diferentes (respectivamente, cobas z 480 Analyzer e LightCycler II 480). A comparação de dois resultados de cada amostra gerou três avaliações por amostra (lab a versus lab b, lab b versus lab c, lab a versus lab c). Com os dados obtidos desta forma, 90 % das avaliações demonstraram ser idênticas. A avaliação da comparação válida resulta em 96,43 % de reprodutibilidade.

12.3. Robustez

Testaram-se as variações seguintes do perfil de temperaturas da série de PCR, sem terem sido observados desvios ao resultado do teste GynTect® final (conduzidos com quatro amostras diferentes e um NTC):

Tabela 18 Variações ao perfil de temperatura

Desvios ao protocolo original	Efeitos na positividade GynTect® PC	Varição média do valor Cp todos os marcadores
65 °C Temperatura de Hibridação	nenhum	< 1
67 °C Temperatura de Hibridação	nenhum	< 1
92 °C Temperatura de Desnaturação	nenhum	< 1
96 °C Temperatura de Desnaturação	nenhum	< 1
96 °C Temperatura de Desnaturação & 10 seg. Desnaturação & 30 seg. Hibridação/Alongamento	nenhum	até 1.12 e superior
96 °C Temperatura de Desnaturação & 20 seg. Desnaturação & 40 seg. Hibridação/Alongamento	nenhum	< 1

A posição da amostra no aparelho de PCR não teve qualquer impacto no resultado GynTect®.

12.4. Desempenho clínico

As amostras de pacientes foram obtidas de hospitais europeus (Alemanha, Portugal, Eslováquia).

O tratamento das amostras de pacientes com bissulfito foi realizado conforme descrito no capítulo 11.4.

Para a determinação do desempenho clínico de GynTect®, foram analisadas 321 amostras de pacientes com as seguintes características: Pap I (n = 199; 62 %), CIN 1 (n = 20; 6,2 %), CIN 2 (n = 28; 8,7 %), CIN 3 (n = 64; 19,9%), carcinoma cervical (n = 10; 3,1 %).

Determinaram-se a sensibilidade e especificidade clínicas com base nas linhas de corte estabelecidas.

Tabela 19 Desempenho clínico de GynTect®

Observação	Deteção 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 confiança

Tabela 20 Sensibilidade e especificidade

Sensibilidade para CIN 3+	Especificidade para CIN 3+	Taxa de falsos positivos para Pap I
67,6 %	89,9 %	4,0 %

13. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- A interpretação dos resultados GynTect® deve ser sempre acompanhada dos resultados de outros procedimentos laboratoriais de diagnóstico, bem como ter em consideração o panorama clínico.
- Tem de se aderir às especificações de acordo com as instruções de utilização, i.e., volumes de pipetagem, tempos de incubação, temperaturas e etapas de preparação para prevenir resultados erróneos.
- Amostragem e armazenamento adequados são críticos para os resultados do teste.
- Em princípio, não se podem excluir em procedimentos de teste de biologia molecular que variantes de sequência raras possam influenciar o resultado do teste, que não estejam ainda contempladas nas fontes consultadas para as análises de especificidade e sensibilidade dos primers e sondas.
- O desempenho não específico do instrumento, bem como desvios ao procedimento de teste descrito, às condições de armazenamento especificadas, aos materiais, ao equipamento ou ao material de amostragem recomendado, podem resultar em diferenças dos resultados obtidos quando todas as especificações são concretizadas.
- Os controlos internos e externos fornecidos são auxiliares para a deteção de falhas. No entanto, podem não detetar todas as falhas possíveis. É da responsabilidade do utilizador validar quaisquer modificações feitas ou, se necessário, os equipamentos usados para garantir cumprimento com as especificações do aparelho.

14. REFERÊNCIAS

- [1] Sung, H. et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71(3):209-249
- [2] Walboomers, J. et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189(1):12-19
- [3] Cuzick et al. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 119(5):1095-1101
- [4] Hansel et al. (2014). A Promising DNA Methylation Signature for the Triage of High-Risk Human Papillomavirus DNA-Positive Women. *PLOS ONE.* Volume 9, Issue 3, e91905
- [5] Schmitz et al. (2017). Performance of a methylation specific real-time PCR assay as a triage test for HPV-positive women. *Clinical Epigenetics.* 9:118
- [6] Schmitz et al. (2018). Performance of a DNA methylation marker panel using liquid-based cervical scrapes to detect cervical cancer and its precancerous stages. *BMC Cancer.* 18:1197
- [7] International Agency for Research on Cancer (2008). European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening – Second edition

15. RESPONSABILIDADE

O GynTect® Kit só pode ser usado de acordo com o seu propósito. Oncnostics GmbH não assume responsabilidade para qualquer outro uso (i.e., não conformidade com as instruções de utilização e uso indevido) e qualquer dano resultante.

16. QUESTÕES E PROBLEMAS

No caso de questões ou problemas com o produto, por favor contate o seu parceiro de contato na oncnostics GmbH.

Pode contatar o apoio técnico da oncnostics GmbH de segunda a sexta entre as 8h e as 16h, através do número: **+49 (0) 3641 5548500**.

Fora do horário de contate, pode alcançar-nos através do e-mail: **gyntect@oncnostics.com**.

oncnostics GmbH

Löbstedter Straße 41

07749 Jena, Alemanha

Direção: Dr. Alfred Hansel, Dr. Martina Schmitz

No caso de ocorrer algum dos erros seguintes durante o processamento das amostras cervicais, desempenho da PCR, análise dos dados e/ou falha de todo o ensaio GynTect® devida a algum dos controlos, proceda conforme descrito abaixo.

Tabela 21 Resolução de problemas

Problema e causa	Observações e sugestões
CENTRÍFUGA Nenhuma centrífuga disponível para as tiras/placas PCR	Agite a tira de 8 poços vigorosamente com o seu pulso, até que todo o líquido esteja no fundo dos poços. O interior da tampa não deve conter gotas. Repita o processo, se necessário.
TEMPERATURAS DE FUSÃO INVÁLIDAS A GynTect® Strip foi colocada no aparelho de PCR rodada em 180° Curvas de amplificação e fusão visíveis, mas as temperaturas de fusão desviam-se substancialmente dos requisitos apresentados no manual	A temperatura de fusão na posição B corresponde à temperatura de fusão da posição G. Os poços A e B mostram amplificação para todas as GynTect® Strips exceto para o controlo negativo. As amostras podem ser analisadas. Por favor contate oncnostics GmbH.

RESULTADO DE PCR NEGATIVO/AUSENTE

Valor Ct do marcador IDS-M acima do valor-alvo

Repita o teste para a amostra usando um novo ensaio GynTect®.

Repita o teste para a amostra usando um novo ensaio GynTect® em opcionalmente um volume de amostragem superior (2 ml a 3 ml). No caso de um resultado adicional negativo para os marcadores, a amostra da paciente não pode ser analisada.

Exceder o valor alvo para o Controlo Positivo GynTect® e/ou Controlo Negativo GynTect®

Repetir GynTect® para todas as amostras com eluatos de amostras cheios (adicionar 80 µl de GynTect® Water).

17. NOTAS ADICIONAIS

Aviso regulatório para os clientes da União Europeia: por favor observe a sua obrigação de reportar à sua entidade competente e à oncgnostics GmbH algum incidente grave que tenha ocorrido em relação a este produto.

A versão atual da Ficha de Dados de Segurança para este produto é fornecida no Centro de Download no website (<http://www.oncgnostics.com/en/downloadcenter/>) ou pode ser solicitada por e-mail para gyntect@oncgnostics.com.

18. SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
	Mastermix		Limitação de temperatura
	Tiras de PCR		Utilizar de preferência antes de
	Tampas		Suficiente para <n> testes
	Controlo Positivo		Fabricante
	Água		Consultar instruções de utilização (IU)
	Diagnóstico <i>in vitro</i>		Armazenar no escuro
	Código do Lote		Não reutilizar
	Número de catálogo		Marca CE

19. LISTA DE ALTERAÇÕES

Versão anterior (Data de publicação)	Alterações
3.5 (Maio 2022)	<ul style="list-style-type: none">– Restruturação, os capítulos no interior das instruções de utilização foram movidos– Capítulo 11.2 Amostragem<ul style="list-style-type: none">○ As condições de armazenamento para amostrais cervicais foram adaptadas– Capítulo 11.5.2 Realização da PCR com o cobas z 480 Analyzer<ul style="list-style-type: none">○ Posição fixa do PC (linha 11) e do NTC (linha 12)○ Removidas as capturas de écran– Adição do capítulo 11.5.3 Realização da PCR com o CFX96 Real-Time PCR Detection System– Foram adicionados os capítulos seguintes:<ul style="list-style-type: none">○ Capítulo 5 Material de referência○ Capítulo 13 Limitações do método○ Capítulo 14 Referências○ Capítulo 15 Responsabilidade○ Capítulo 17 Notas adicionais○ Capítulo 19 Lista de alterações

20. PROCEDIMENTO RESUMIDO

De seguida encontra uma cópia do modelo do procedimento resumido em forma de checklist.

Antes de utilizar este procedimento resumido, por favor leia as instruções completas no capítulo 11.

O kit de bissulfite não faz parte do GynTect® Kit. O tratamento das amostras com bissulfite tem de ser realizado utilizando o Kit EpiTect® Fast Bisulfite (10).

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Agite a amostra da paciente durante 5 seg. à velocidade máxima e transfira 1 ml de meio para um tubo de 1,5 ml
- Centrifugue a amostra durante 5 min a 10.000 xg
- Remova 900 µl do sobrenadante acima do pellet e elimine

TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM BISSULFITO

- Prepare os tampões do EpiTect® Fast Bisulfite Kit de acordo com a Tabela a

Tabela a Composição dos tampões do EpiTect® Fast Bisulfite Kit (Qiagen)

Tampão	Adicionar Etanol
Buffer BL *	-
Buffer BW	30 ml Etanol (96 - 100 %)
Buffer BD	27 ml Etanol (96 - 100 %)

* não adicionar *Carrier RNA*, controlo de qualidade

- Monte a reação de acordo com a Tabela b, num tubo de 0,5 ml, agite e centrifugue

Tabela b Reação com bissulfito

Composto	Por reação
Bisulfite Solution*	85 µl
DNA Protect Buffer	15 µl
Amostra ressuspendida	40 µl
Volume total/reação	140 µl

* Controlo de qualidade

- Conversão usando um termociclador, verifique o perfil de temperaturas de acordo com a Tabela 7
- Agite as amostras e centrifugue brevemente
- Adicione **310 µl Buffer BL** à MinElute® Spin Column
- Adicione a amostra e pipete 5 x para cima e para baixo
- Adicione **250 µl Etanol** (96 - 100 %), misture 5 x por inversão do pivot da coluna
- Centrifugue a coluna durante 30 seg. a 18,000 xg e elimine o escoamento
- Adicione **200 µl Buffer BW** e centrifugue a coluna durante 30 seg. a 18.000 xg
- Adicione **200 µl Buffer BD** e incube à temperatura ambiente durante 15 min
- Centrifugue a coluna durante 30 seg. a 18.000 xg
- Adicione **200 µl Buffer BW** e centrifugue a coluna durante 30 seg. a 18.000 xg e elimine o escoamento
- Adicione **400 µl Buffer BW** e centrifugue a coluna durante 30 seg. a 18.000 xg
- Adicione **200 µl Etanol** (96 - 100 %) e centrifugue a coluna durante 30 seg. a 18.000 xg

- Coloque a coluna num tubo de recolha de 2 ml novo e centrifugue a coluna durante 60 seg. a 18.000 xg
- Coloque a coluna num tubo de 1,5 ml, adicione **20 µl Água** e incube durante 60 seg. à temperatura ambiente
- Centrifugue a coluna durante 60 seg. a 8.000 xg
- Ponto de paragem opcional:* o fluxo de trabalho pode ser interrompido aqui, as amostras podem ser armazenadas

PREPARAÇÃO E PIPETAGEM DA PCR

- Adicione **70 µl GynTect® Water** a cada amostra, agite e centrifugue brevemente
- Agite e centrifugue brevemente a **GynTect® Mastermix**
- Retire as tampas coloridas das **GynTect® Strips** a usar
- Adicione **10 µl GynTect® Mastermix** a cada poço de reação
- Adicione **10 µl amostra** ou **GynTect® Positive Control** ou **GynTect® Water** a cada um dos oito poços correspondendo a uma **GynTect® Strip**
- Feche as **GynTect® Strips** com **GynTect® Caps**
- Agite e centrifugue as **GynTect® Strips** brevemente

DESEMPENHO DA PCR

- Inicie o aparelho de PCR, abra o software e selecione o modelo (GynTect)
- Nomeie as séries de PCR individualmente, prepare o esquema das placas e verifique o perfil de temperaturas
- Guarde a série de PCR
- Coloque as **GynTect® Strips** no aparelho e inicie a série PCR
- Após completar a PCR, escolha as definições de avaliação e exporte o ficheiro .txt ou .xlsx

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA PCR

- Abra os ficheiros exportados (.txt ou .xlsx) num programa de folha de cálculo apropriado
- Verifique os resultados do **Controlo Positivo** e **Controlo Negativo** para todos os marcadores
- Verifique todas as amostras quanto à validade e positividade de acordo com a Tabela c

Tabela c Critérios para validade e positividade

Marcador	Valor Ct	Gama da temperatura de fusão (cobas)	Gama da temperatura de fusão (CFX)	ΔCt (Marcador x - IDS-M)	Critério para
ASTN1	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 86 °C	78 °C - 86 °C	≤ 8.00	positividade
DLX1	$\geq 20, \leq 42$	79 °C - 85 °C	77 °C - 85 °C	≤ 9.00	
ITGA4	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	≤ 9.00	
RXFP3	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 85 °C	78 °C - 85 °C	≤ 9.00	
SOX17	$\geq 20, \leq 42$	81 °C - 87 °C	79 °C - 87 °C	≤ 9.00	
ZNF671	$\geq 20, \leq 42$	80 °C - 87 °C	78 °C - 87 °C	≤ 10.00	
ACHE	$\geq 20, \leq 42$	78 °C - 83 °C	76 °C - 83 °C	-	validade
IDS-M	$\geq 20, \leq 32$	78 °C - 88 °C	76 °C - 88 °C	-	

- Avalie os **resultados GynTect®**

Tabela d Valores para os marcadores GynTect®

Marcador	Valor, se marcador for positivo	Valor, se marcador for negativo
ASTN1	2	0
DLX1	1	0
ITGA4	2	0
RXFP3	2	0
SOX17	2	0
ZNF671	6	0

Soma de todos os valores ≥ 6
→ GynTect® positivo

O resultado positivo do teste GynTect® está correlacionado com a presença de uma neoplasia intraepitelial cervical ou carcinoma cervical. O resultado de GynTect® não deve ser usado para a decisão terapêutica final, deve ser avaliado em combinação com outras observações clínicas.