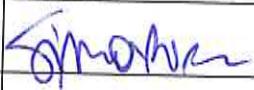
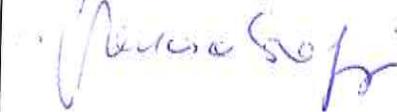
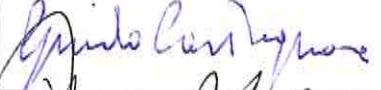


Gruppo di redazione: Chiara Di Stefano, Nicaela Aspite, Luciana Rossi, Virginia Becattini, Antonella Asta, Armelle Munnia, Paola Cifarelli, Ilaria Rigacci, Simonetta Bisanzi, Francesca Carozzi.

	NOME	FUNZIONE	DATA	FIRMA
REDAZIONE	Simonetta Bisanzi	Dirigente Biologo	22/12/2015	
	Francesca Carozzi	Direttore S. S. Laboratorio Regionale HPV e Biologia Molecolare	22/12/2015	
VERIFICA	Guido Castiglione	Referente per la Qualità e l'Accreditamento	22/01/2016	
APPROVAZIONE	Riccardo Poli	Direttore Sanitario	20/06/2016	

INDICE

1. SCOPO	pag. 3
2. CAMPO DI APPLICAZIONE	pag. 3
3. TERMINOLOGIA E ABBREVIAZIONI	pag. 3
4. RESPONSABILITÀ	pag. 3
5. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ	pag. 4
6. RIFERIMENTI	pag. 4
7. ALLEGATI	pag. 11
8. APPARECCHIATURE	pag. 11
	pag. 12

DISTRIBUZIONE

La presente procedura viene distribuita ai Responsabili delle seguenti Strutture, Centri di Responsabilità o Uffici che, a loro volta, provvedono a distribuirla e, ove occorra, ad illustrarla al personale interessato appartenente alla propria struttura

		Si/No
Direzione Generale		SI
Direzione Sanitaria		SI
Direzione Amministrativa		SI
Coordinamento Assistenziale e della Prevenzione		SI
Coordinamento Tecnico Sanitario		SI
Coordinamento Statistico		
S.S. Bilancio, Contabilità e Investimenti		
Ufficio Comunicazione, Attività editoriali e Pianificazione eventi scientifici		
S.S. Centro di Riabilitazione Oncologica (Ce.Ri.On)		
STRUTTURE COMPLESSE	STRUTTURE SEMPLICI COLLEGATE	
Laboratorio Regionale di Prevenzione Oncologica	Laboratorio Regionale HPV e Biologia Molecolare	SI
	Citologia Extra Screening e Sistema Qualità in Citologia	
Senologia Clinica		
Screening e Prevenzione Secondaria	Senologia di Screening	SI
	CRR Prevenzione Oncologica	
Epidemiologia Clinica	Infrastruttura e Coordinamento Registri	
	Valutazione Screening e Osservatorio Nazionale Screening (O.N.S.)	
Epidemiologia dei Fattori di Rischio e degli Stili di Vita	Epidemiologia dell'Ambiente e del Lavoro	
Biostatistica Applicata all'Oncologia		
Amministrazione, Gestione Risorse, Attività Tecniche e Supporto alla Ricerca		
Ufficio Relazioni con il Pubblico		

INTRODUZIONE

All'interno della S.S. Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare la tipizzazione tipo specifica dei Beta Papilloma Virus umani (HPV typing) con amplificazione genica rappresenta un'attività di rilievo. L'HPV typing viene effettuato sia come attività routinaria su soggetti che si presentano con richiesta medica, sia all'interno di specifici progetti di ricerca, ciascuno con una sua diversa procedura di applicazione.

Le metodologie di laboratorio applicate sono altamente specialistiche e l'implementazione di un sistema di qualità per il governo dei requisiti organizzativi stabiliti rappresenta una priorità assoluta.

La S.S. Laboratorio regionale HPV e biologia molecolare esegue esami di genotipizzazione HPV su più tipologie di materiali: cervico-vaginale, vulvare, urinale, prelievi balano-prepuziali, uretrali, anali, sperma, biopsie faringeali e laringee, ecc..

1. SCOPO

- Descrivere l'iter interno del processo relativo al Test HPV ricerca e genotipizzazione svolta sia come attività routinaria che all'interno di specifici progetti di ricerca;
- garantire uniformità di comportamento e costanza nei tempi;
- garantire la costanza di tutte le fasi preanalitiche, analitiche e post analitiche.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Tale procedura si applica nell'ambito della attività di pertinenza della S.S. Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare di ISPO.

La presente procedura esamina per i test effettuati su presentazione di ricetta medica tutti i passaggi dell'iter di laboratorio che comprende:

- Modalità di prelievo e di raccolta campione
- Consegna del campione in laboratorio
- Identificazione e accettazione del campione
- Trattamento ed analisi del campione
- Interpretazione e refertazione
- Consegna risposte
- Controlli di qualità.

La presente procedura esamina, inoltre, anche gli aspetti procedurali generali del genotyping effettuato all'interno di progetti di ricerca, per i quali il protocollo di studio prevede l'effettuazione di test diversi da quello utilizzato nella routine.

3. TERMINOLOGIA E ABBREVIAZIONI

ACCE: Procedura informatica per inserimento dati anagrafici e gestione ricette

AMBU: Procedura informatica per prenotazione esami con dati anagrafici dell'utente; contiene tutti i codici relativi alle prestazioni effettuate all'interno dell'Istituto

ASF/ex ASF: ex Azienda Sanitaria Firenze

CED: Centro elaborazione dati

CQI: Controllo di Qualità Interno

Data accettazione: E' la data di inserimento dei dati anagrafici ed anamnestici della paziente nel software gestionale

Data refertazione: E' la data di inserimento del risultato dell'esame nel software gestionale
HPV: Human Papilloma Virus

Nomenclatore tariffario regionale: E' l'atto formale nel quale sono indicate le singole prestazioni specialistiche, di diagnostica strumentale e di laboratorio erogabili dal servizio sanitario regionale in regime ambulatoriale.

NUTE: Procedura Informatica di Archiviazione esami in Laboratorio Regionale Prevenzione Oncologica

PCR: Polimerase Chain Reaction

RLB: Reverse Line Blot

TSLB: Tecnico Sanitario Laboratorio Biomedico

VEQ: Valutazione Esterna di Qualità

4. RESPONSABILITÀ

Figura che svolge l'attività	Personale Amministrativo	Personale Front office e Back Office	TSLB	Dirigente Biologo	Contrattista o borsista assegnato a specifico progetto di ricerca	Responsabile del progetto
1. Presa in carico e Accettazione esami		R	C	C	R	C
2. Fase preanalitica e conservazione campioni			R	C	R	C
3. Esecuzione esami			R	R	R	C
4. Refertazione esami	C	C		R	R	R
5. Controllo di qualità			C	R	C	R

R = Responsabile C = Coinvolto

5. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

La genotipizzazione HPV viene effettuata:

1. Dietro presentazione di richiesta del medico curante, dello specialista, dai reparti dove il paziente è ricoverato o nell'ambito di convenzioni con altri enti. L'esame è soggetto a ticket, ad eccezione degli esami richiesti per controllo di pazienti già trattati per patologie inerenti e per pazienti ospedalizzati, per i quali sono previste procedure di rimborso da parte dell'Azienda Sanitaria che ha richiesto la prestazione.
 - a. In questo caso viene utilizzato il sistema denominato "Ampliquity HPV type-Express AB Analitica", risultato aggiudicatario in ESTAV centro per questa tipologia di esami.
2. All'interno di specifici progetti di ricerca con il protocollo e metodo stabilito all'interno del progetto di ricerca:
 - a. Studio GDS02E: in questo caso il protocollo prevede l'utilizzo del sistema di genotipizzazione 'INNOLIPA'.

Le metodologie vengono entrambe descritte in questa procedura, con istruzioni operative comuni o specifiche del singolo protocollo

ISPO	Procedura	Codice Aziendale CP005
	HPV Typing	Pagina 5 di 12
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	Ed. 3 Rev.1

5.1 Modalità di prelievo e di raccolta campione

a) campioni con richiesta medica

La S.S. Laboratorio HPV e oncologia molecolare esegue la genotipizzazione HPV in:

- prelievi cervico-vaginale (vetrino o provetta apposita con conservante)
- prelievo vulvare (vetrino o provetta apposita con conservante)
- urine
- prelievo balano-prepuziale
- prelievo uretrale
- prelievo/scraping anale
- sperma
- saliva
- tessuti
- biopsie
- altro materiale

I campioni con richiesta medica possono essere prelevati e conservati secondo l'istruzione operativa "Tipologia campioni e modalità di raccolta" (Allegato 1). Il personale del front-office di ISPO (sportello laboratorio) fornirà a medici e pazienti le informazioni ivi contenute. Per casi particolari contatterà il Dirigente responsabile del Laboratorio HPV.

I campioni afferenti a studi e progetti di ricerca sono raccolti secondo quanto riportato nello corrispondente protocollo di ricerca.

5.2 Arrivo del materiale in ISPO

b) campioni con richiesta medica

Per i campioni non afferenti a studi, il test per la ricerca e tipizzazione di HPV viene effettuato dietro presentazione:

- di richiesta del medico curante
- di richiesta dello specialista
- di richiesta del medico di reparto di degenza in caso di pazienti ricoverati o in Day-Hospital.

Il prelievo cervicale può essere effettuato anche presso ISPO: la paziente deve contattare l'ufficio prenotazioni personalmente o telefonicamente al numero 055 32697871, prenotando così un appuntamento nell'ambulatorio HPV; l'ostetrica provvederà al prelievo necessario per il test HPV secondo quanto richiesto sulla ricetta medica.

Per campioni già prelevati dallo specialista, il paziente/la paziente si recheranno direttamente all'accettazione al front office di ISPO (tel 055 32697871).

L'esame viene accettato dal lunedì al venerdì dalle ore 8.00 alle ore 14.00, il giovedì dalle ore 8 alle ore 18.00.

La ricetta medica dovrà riportare una delle seguenti diciture:

- "Si richiede ricerca e tipizzazione virus HPV (o papilloma virus)"
- "Si richiede ricerca e tipizzazione virus HPV con PCR"
- "Si richiede tipizzazione HPV in PCR"
- "Si richiede HPV test"
- "Si richiede HPV test con tipizzazione"
- "Si richiede HPV DNA"
- "Si richiede HPV"

	Procedura	Codice Aziendale
	HPV Typing	CP005 Pagina 6 di 12
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	Ed. 3 Rev.1

- o qualsiasi altra dicitura che non sia HPV Alto rischio per le quali viene effettuato il test HC2 ad alto rischio (vedi procedura CP003).

Se il prelievo viene effettuato presso ISPO, nella richiesta medica deve essere specificato "Si richiede con prelievo".

L'esame è soggetto a ticket secondo la normativa vigente.

I tempi di risposta sono entro 21 giorni, tempo medio di risposta è 10 giorni.

Il personale è tenuto a rispettare la riservatezza dei dati e delle informazioni trattate.

c) campioni afferenti a studi

Le modalità di arrivo dei campioni afferenti a studi o progetti di ricerca è riportato all'interno di ciascun progetto di ricerca. Per lo studio GDS02E i campioni arrivano tramite DHL generalmente una volta alla settimana e vengono consegnati direttamente al personale della S.S. Laboratorio regionale HPV e biologia molecolare, secondo le modalità specifiche riportate nel protocollo dello studio.

5.3 Presa in carico, identificazione e accettazione del campione

a) Test con richiesta medica

Il personale del front office ISPO provvede all'accettazione e alla presa in carico degli Esami HPV. Per campioni consegnati e non prelevati ad ISPO, il personale del front-office di laboratorio deve verificare le date del prelievo e le modalità di conservazione, come riportato nella presente procedura (Allegato 1: Istruzione operativa per la raccolta e conservazione campioni).

Prelevi non conformi o con dati incompleti, che non consentono comunque l'accettazione dello stesso, comportano la non presa in carico del campione (vedi Procedura di istituto Presa in carico campioni biologici numero IP016).

Una volta che il campione è stato preso in carico, il personale del back office ISPO provvede all'accettazione degli Esami HPV nel Programma Gestionale X4J, seguendo due fasi:

1) Fase al front office accettazione richieste:

a. Inserimento in Acce:

Controllo dati anagrafici se il nominativo è inserito, altrimenti inserimento con F1
Accettazione richiesta medica (L73; UO02 per prelievo se previsto)
Stampa etichette

Se la ricetta contiene l'indicazione di eseguire l'esame su più tipologie di prelievo per lo stesso soggetto (esempio, vulva e cervice, o urine e sperma), l'inserimento in acce della ricetta dovrà duplicare la prestazione.

2) Fase back office accettazione esame in Nute:

Aprire la procedura NUTE

- Opzione 3 "Ricerca paziente con codice"
- Inserire il codice Ispo
- Confrontare i dati anagrafici con la scheda cartacea
- Digitare F6 "Accettazione esame"
- Inserire:

- Data prelievo
- Tipo Esame (6)
- Mittente
- Sigla Prelevatore
- Preparato (6)

- Tipo di Materiale (1)
- Tipo risposta
- Tipo pagamento
- Data arrivo
- Consenso medico (sì/no)
- Consenso telefono (sì/no)

F10 = VARIAZIONE ANAGRAFICA
F5 = INSERIMENTO ESAMI

F6 = ACCETTAZIONE ESAMI

F2 = ELENCO ESAMI
F3 = MENU

NU05 INSERIMENTO ESAME : A A
===== CODICE: 650073

DATA ESAME
TIPO ESAME
MITTENTE
SIGLA
N. REGISTRO
PREPARATO
TIPO MATERIALE
N. VETRINO
BIOLOGO

INVIO = INSERIMENTO

FP3 = ANNULLO OPERAZIONE

Una volta verificata l'anagrafica e completato l'inserimento dei dati, il programma NUTE genera in automatico il numero progressivo HPV e si può procedere con la stampa delle due etichette termostabili. Digitare F2 "Stampa etichetta" questa opzione consente la stampa di due etichette termostabili, apporre una etichetta sulla provetta, una sulla scheda. Le etichette hanno i seguenti dati in chiaro: cod.ispo, numero di registro e tipo esame 6; il barcode contiene il codice ISPO preceduto da F, data accettazione, n° registro HPV.

Il personale del front-office, nel caso di campioni che secondo l'allegato 1 della presente procedura devono essere messi in frigo o pretrattamenti immediatamente, al momento del ricevimento del loro ricevimento comunica telefonicamente con il laboratorio (TSLB) e invia anche una mail al personale TBLS della S.S. Laboratorio regionale HPV e biologia molecolare e ai Dirigenti per conoscenza.

b) Test afferenti a studi e progetti di ricerca

I campioni afferenti a studi non vengono presi in carico e/o accettati dal personale del front office o back office, ma seguono le secondo le modalità specifiche riportate nel protocollo dello studio.

5.4 Trasferimento dei campioni dal front office in laboratorio

a) Test con richiesta medica

I campioni vengono trasferiti giornalmente dal front-office al laboratorio con fotocopia del registro consegna test HPV. IL TSLB firma per ricevuta dopo verifica congruità numerica, del tipo materiale in modo da garantire l'idonea conservazione del materiale.

b) Test afferenti a studi e progetti di ricerca

I campioni afferenti a studi non vengono presi in carico e/o accettati dal personale del front office o back office, ma seguono le secondo le modalità specifiche riportate nel protocollo dello studio.

5.5 Verifica campioni consegnati in laboratorio, fase pre analitica e conservazione del campione

a) Test con richiesta medica

Il personale TSLB procede giornalmente alla verifica dei campioni consegnati in laboratorio, al loro eventuale pretrattamento, alla loro conservazione (Allegato 2) e alla loro registrazione sulla Scheda fasi tipizzazione (All. 25).

I campioni vengono conservati per l'estrazione del DNA per la ricerca e tipizzazione del Papillomavirus umano (HPV) in base alla stabilità per tipo di campione biologico, come riportato nell'Allegato 2 (Istruzione Operativa: Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici).

Se il campione risulta non conforme, viene compilato apposito modulo (All. 3 "Modulo di non conformità di laboratorio") e lo consegna al Dirigente insieme alla scheda paziente.

b) Test afferenti a studi e progetti di ricerca

Per questa fase i campioni afferenti a studi seguono le secondo le modalità specifiche riportate nel protocollo dello studio.

5.6 Esecuzione fase di laboratorio: seduta analitica

Nell'intera procedura di analisi, il personale in laboratorio (TSLB, Dirigente, personale a progetto, borsisti, ecc.) segue le indicazioni e le precauzioni di buona pratica di laboratorio (All. 4 Istruzione Operativa Generalità Buona pratica in PCR e RLB).

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS) disponibili in laboratorio.

a) Test con richiesta medica

I campioni vengono analizzati secondo la specifica istruzione operativa "Estrazione DNA da campioni biologici" (All. 5) e istruzione operativa "Identificazione e tipizzazione HPV con PCR e reverse line blot con Ampliquity HPV type-Express" (All. 6).

b) Test afferenti a studi e progetti di ricerca

I campioni vengono analizzati secondo i principi generali e quanto riportato nell'Istruzione operativa "estrazione DNA" (All. 5) in base alla tipologia di materiale utilizzato e specificati nei dettagli nel protocollo di studio. PCR e RLB sono effettuati secondo i principi generali riportati nell'istruzione operativa "INNOLIPA extra" (All. 7) e meglio specificati nei dettagli nel protocollo di studio.

5.7 Controlli di qualità interni

a) Test con richiesta medica

In ogni seduta di analisi vengono inseriti controlli interni per le varie fasi del processo: estrazione, pcr e RLB, secondo quanto meglio specificato nella Istruzione operativa All. 6 (Ampliquality controlli di qualità interni e ed esterni).

Nel caso di seduta con controlli non validi, si procede seguendo le specifiche azioni correttive dettagliate nell'All. 8: Istruzione Operativa "Validazione e Refertazione Risultati Ampliquality AB" al paragrafo 'azioni correttive e test di verifica'.

b) Test afferenti a studi e progetti di ricerca

Vedi All. 7 Istruzione operativa "Innolipa extra" e All. 9 Istruzione operativa 'Validazione e refertazione risultati INNOLIPA Genotyping extra'.

5.8 Controlli di qualità esterni

Il laboratorio aderisce ad almeno un programma di controllo di qualità esterno annuale, che prevedono la stesura di un report intermedio e di un report finale del Dirigente Responsabile di settore. Il laboratorio aderisce inoltre, se disponibili, a proficiency panel del WHO annualmente con tutte le tipologie di Typing in uso in laboratorio sia per attività routinaria che di ricerca .

Il materiale della VEQ viene ricostituito e processato secondo le istruzioni fornite dal produttore dal Responsabile del laboratorio o da suo sostituto delegato. Le VEQ vengono eseguite dal TSLB o dal Biologo Dirigente della S.S. secondo le indicazioni del Responsabile del settore. Il responsabile del settore di laboratorio o suo delegato provvede all'invio on-line dei risultati, secondo le modalità specifiche e alla loro archiviazione nel raccoglitore 'VEQ HPV' in attesa del report finale. Il report finale della VEQ (invia da ditta produttrice) viene analizzato dal Responsabile che, dopo la verifica, provvede a firmarli e a stendere un rapporto che viene condiviso con gli operatori coinvolti nel processo. Il report finale e il rapporto interno di verifica vengono quindi archiviati nel raccoglitore 'VEQ HPV' collocato nella stanza del Responsabile del laboratorio della S.C. di Citologia Analitica e Biomolecolare.

Se i risultati inviati non sono in linea con i risultati presenti nel report (relativi al proprio metodo), viene attivata la procedura di verifica:

- valutare se i dati sono stati inseriti correttamente
- rivedere i dati della sedute nella quale è stata eseguita la valutazione della VEQ
- rivedere l'intera procedura di esecuzione della VEQ (dalla ricostituzione del campione fino alla esecuzione del test)
- verificare con quali metodi è stata eseguita la VEQ e con quali risultati
- verificare chi ha effettuato la veq con il metodo in analisi
- richiedere il re-invio di un'aliquota della VEQ non conforme (da valutare in base al tipo di non conformità osservata)
- concludere a quale dei seguenti motivi si è giunti (All. 10 non conformità VEQ)
- l'All. 10 è quindi archiviato nel raccoglitore 'VEQ HPV' collocato nella stanza del Responsabile del laboratorio HPV della S.C. di Citologia Analitica e Biomolecolare.

5.6 Validazione, Interpretazione e refertazione dei risultati

a) Test con richiesta medica

Il Dirigente Responsabile procede con la validazione dei risultati (vedi All. 8 Istruzione Operativa 'Ampliquity AB Validazione, interpretazione e risultati'). Nel caso evidenzi anomalie dei controlli interni, o del risultato dei campioni, possibili inquinamenti o altro, dà indicazioni per le azioni da intraprendere e per gli eventuali campioni da ripetere, riportandole sul registro di laboratorio 'Tipizzazioni HPV'.

b) Test afferenti a studi e progetti di ricerca

Il Dirigente Responsabile procede con la validazione dei risultati (vedi Allegato 9 Istruzione Operativa 'Innolipa EXTRA Validazione e interpretazione dei risultati'). Ulteriori indicazioni possono essere indicate nel protocollo specifico dello studio o progetto di ricerca.

5.7 Inserimento risultati nel gestionale di laboratorio

a) Test con richiesta medica

Il biologo dirigente che ha validato i risultati procede con l'inserimento dei risultati in Nute. Opzione 7 (completamento con barcode); si legge il codice a barre del campione, si toglie la F iniziale e si aggiunge 6 finale (tipo esame) e si dà invio: si apre la mascherina per il completamento esame vengono riportati i risultati scritti sulla scheda.

NU27 COMPLETAMENTO ESAME : TUBINI TINA			
----- CODICE: 650078			
DATA ESAME : 02 08 013			
TIPO ESAME : 6			
MITTENTE : 01_			
SIGLA : N. REGISTRO .. : 22930			
PAGAMENTO TICKET .. : 02 003 CONVENZIONE SCREENING ASL 11			
VIRUS ACIDI NUCL. .. : - - -			
TIPIZZAZIONE : - - - - -			
mRNA E6/E7 : CARICA VIRALE .. :			
NOTE :			
METODO : _____			
BIOLOGO : _____			
INVIO = CONFERMA	F2 = CODICI	F12 = ALTRI TEST	F3 = ANNULLO OPERAZIONE

Codifica risposte HPV

Virus acidi nucleici 01 1 = negativo 4 = positivo 5 = non valutabile

Tipizzazione 4 + numero tipo HPV 5 = non tipizzabile

b) Test afferenti a studi e progetti di ricerca

Vedi protocollo progetto di ricerca

5.8 Stampa e firma Risposte esami: solo per test con richiesta medica

Il personale amministrativo del laboratorio procede alla stampa dei referti, da xpool "lettere tipi", secondo il relativo modello di risposta (All. 24) e li abbina alla relativa scheda di richiesta.

Il Dirigente Responsabile controlla i dati inseriti nel referto e appone firma e timbro.

I referti vengono restituiti al personale amministrativo del laboratorio per la consegna secondo le indicazioni riportate sulla scheda di richiesta dell'esame.

5.7 Consegnna e/spedizione risposte hpv: solo per test con richiesta medica

Le pazienti possono:

- 1) ritirare la risposta personalmente: front-office Villa delle Rose secondo le procedure di istituto previste per il ritiro (dal lunedì al venerdì dalle ore 8.00 alle ore 14.00, il giovedì dalle ore 8 alle 18.00);
- 2) richiedere invio postale: solo su indicazioni della paziente, da specificare sulla delega per ritiro risposta controfirmato dalla paziente stessa. Mettere risposta in una busta con l'indirizzo della paziente e seguire la procedura ISPO per l'invio postale;
- 3) invio diretto al Medico richiedente: solo su indicazioni della paziente , da specificare sulla delega per ritiro risposta controfirmato dalla paziente stessa.

Le risposte ai pazienti ricoverati vengono inviate allo stesso reparto di provenienza.

6. RIFERIMENTI

- DPR 14.01.1997 e modifiche al DL502 del 30.12.92
- LR 8 (23.02.1999)
- DCR 30 (01.02.2000)
- LR 40/2008
- LR 51 (05.08.2009)
- DPGR 61 (24.12.2010), diviene istituzionale e obbligatorio, per le strutture sanitarie pubbliche e private, il possesso dei requisiti strutturali (entro 5 anni), tecnologici (entro 3 anni), e organizzativi (entro 1 anno) stabiliti dalla Regione Toscana.
- WHO HPV laboratory manual I° Edition 2009

7. ALLEGATI

Allegato 1: Tipologia prelievi e modalità di raccolta

Allegato 2: Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici

Allegato 3: Modulo non conformità di laboratorio typing

Allegato 4: Istruzione operativa generale di buona pratica in pcr e RLB

Allegato 5: Istruzione operativa estrazione DNA

Allegato 6: Ampliquility test PCR e typing

Allegato 7: Istruzione operativa INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II PCR e RLB

Allegato 8: Ampliquility test Validazione risultati e Refertazione risultati

Allegato 9: Istruzione operativa INNO-LiPA extra II - Refertazione HPV TYPING

Allegato 10: Non conformità VEQ

Allegato 11: Istruzione operativa pcr beta globina

Allegato 12: Istruzione operativa Innolipa PCR tipo specifiche

Allegato 13: Istruzione operativa Innolipa PCR GP5+/GP6+

Allegato 14: Istruzione operativa Innolipa sequenziamento DNA di HPV

Allegato 15: Innolipa Schede di sicurezza (MSDS INNO-LiPA)

Consultabili nella stanza 67 a del LRPO

Allegato 16: Manuale AUTOLIPA instrument (Training Manual Auto-LiPA 48)

Allegato 17: Manuale sistema LIRAS lettura strisce

Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

Allegato 18: Scheda di sicurezza Ampliquity test

Allegato 19: Manuale d'uso Ampliquity test

Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

Allegato 20: Manuale d'uso Ampliquity test Autoblot 3000h

Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

Allegato 21: Manuale d'uso Ampliquity test scanner e software

Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

Allegato 22: QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots, body fluids, cultured cells, swabs, and tissue.

Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

Allegato 23: QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook For purification of genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

Allegato 24: Modelli risposta

Allegato 25: Scheda fasi tipizzazione (routine)

Allegato 26: Modello registro HPV interno lab (ricerca)

Allegato 27: Report seduta analitica

Allegato 28: Check list prevenzione contaminazione

Allegato 29: Estrazione automatica con QIAasympathy DSP

Allegato 30: Istruzioni per l'uso (manuale) del kit QIAasympathy® DSP Virus/Pathogen.

Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

8. APPARECCHIATURE

La dotazione strumentale per ricerca e tipizzazione HPV con amplificazione genica comprende:

- Thermal Cycler
- Autoblot
- Scanner, Terminale e Stampante
- Frigorifero per conservare i reattivi e i campioni
- Congelatore per la conservazione dei reattivi e dei campioni
- Centrifuga
- Vortex
- Cappa a flusso laminare
- Incubatore a secco

Gruppo di redazione: Francesca Carozzi, Simonetta Bisanzi, Cristina Sani.

1. SCOPO

Definire la tipologia di campioni su cui può essere eseguita la genotipizzazione HPV (Human Papilloma Virus), le modalità di prelievo e/o raccolta, le modalità di conservazione del campione prelevato, le modalità del loro invio e/o consegna ad ISPO.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione operativa deve essere seguita dal personale medico o personale sanitario che effettua i prelievi o direttamente dai pazienti, in caso di campioni auto prelevabili su cui viene richiesta la Genotipizzazione HPV.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

Tipologia di campioni

La genotipizzazione HPV può essere eseguita:

- su campioni auto prelevati (urine, sperma, saliva);
- su campioni prelevati in ambulatorio da personale medico o sanitario abilitato: prelievi cervicali, vaginali, anali, scraping balano-prepuziali, secreto uretrale, tamponi uretrali, scraping anali, scraping buccali o altri prelievi di cellule da altri distretti. I prelievi in questo caso possono essere strisciati su vetrino e fissati o raccolti in provette con tampone di conservazione.

Modalità di raccolta, conservazione ed invio campioni al laboratorio

a) Campioni prelevati dal medico o personale sanitario abilitato

I prelievi cervicali, vaginali, anali, scraping balano-prepuziali, secreto uretrale, tamponi uretrali, scraping anali, scraping buccali o altri prelievi di cellule da altri distretti, una volta prelevati da personale medico o sanitario abilitato, possono essere strisciati su vetrino e fissati o raccolti in provette con tampone di conservazione. Per le loro modalità di conservazione occorre attenersi a quanto specificato dal produttore. I sistemi più comunemente utilizzati sono il prelievo in Thin Prep, che secondo le indicazioni del produttore può essere conservato a temperatura ambiente per 6 settimane.

Per prelievi vaginali, anali e scraping buccali il laboratorio fornisce, su richiesta dei medici, operatori sanitari o pazienti che debbano effettuare il prelievo, le provette con conservante (STM Qiagen). In questo caso i campioni possono essere mantenuti per un massimo di 2 settimane a temperatura ambiente. Il periodo di conservazione arriva a 3 settimane se il campione viene conservato a +4°C.

I campioni cervicali possono essere eseguiti anche in ISPO (contattare il numero telefonico 05532697871).

b) URINE

Le urine devono essere raccolte in un contenitore sterile a bocca larga con tappo a vite tipo per urino-coltura, acquistabile in farmacia (non fornito da ISPO).

Possono essere utilizzati anche contenitore con tampone conservante (Thinprep o Surepath) (non fornito da ISPO).

Modalità di raccolta:

- procedere ad un'accurata pulizia delle mani e dei genitali esterni (lavarsi con acqua e sapone e sciacquare con abbondante acqua)
- raccogliere le urine della prima minzione del mattino, o almeno 3 ore dopo l'ultima minzione, nel seguente modo:

- Scartare il primo getto e, senza interrompere la minzione, raccogliere direttamente il mitto intermedio nell'apposito contenitore sterile;
- Riempire il contenitore per circa 2/3 (evitare di riempire eccessivamente il contenitore, leggermente oltre la metà);
- Richiudere ben il tappo a vite controllando che non fuoriesca l'urina;
- Se è stato ritirato presso l'accettazione ISPO l'apposito barattolo con conservante, travasare immediatamente parte dell'urina raccolta, fino al segno indicato.

Consegna del campione in laboratorio:

- Entro 2 ore dalla raccolta, ponendo molta attenzione a non sottoporre il campione ad eccessive variazioni di temperatura (non al di sotto di 10°C e non al di sopra di 35°C), se si usa il solo contenitore acquistato in farmacia.
- Entro 48 ore dalla raccolta, se si dispone del contenitore con conservante.

c) SPERMA

Per la raccolta dello sperma deve essere utilizzato un contenitore sterile a bocca larga con tappo a vite tipo per urino-coltura, acquistabile in farmacia (non fornito da ISPO).

Modalità di raccolta:

- urinare prima della raccolta;
- procedere ad un'accurata pulizia delle mani e dei genitali esterni (lavarsi con acqua e sapone e sciacquare con abbondante acqua);
- raccogliere il liquido seminale per masturbazione nell'apposito contenitore, evitando di toccare l'interno ed i bordi del contenitore stesso;
- richiudere il tappo a vite senza inquinare il contenuto.

NOTA: evitare assolutamente metodi di raccolta con profilattici (per la presenza di sostanze immobilizzanti gli spermatozoi) o con il coito interrotto per evitare inquinamento con altro materiale.

Consegna del campione in laboratorio:

- il campione deve essere consegnato al laboratorio entro 2 ore dalla raccolta, ponendo molta attenzione a non sottoporre il campione ad eccessive variazioni di temperatura (non al di sotto di 10°C e non al di sopra di 35°C).

d) SALIVA

Raccogliere la saliva in un contenitore sterile a bocca larga con tappo a vite tipo per urino-coltura, acquistabile in farmacia (non fornito da ISPO), dopo risciaco e gargarismi della bocca con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).



HPV genotyping

Allegato 1

Tipologia campioni e modalità
di raccolta e/o prelievo

Pag. 3 di 3

Ed.3 Rev.1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

Consegnare il campione in laboratorio entro 2 ore dalla raccolta.

e) Campioni istologici

I campioni istologici comprendono biopsie fresche, congelate o fissate in formalina ed incluse in paraffina. Il medico procederà al prelievo come di routine. Nel caso che il tessuto venga fissato e poi incluso in paraffina, si raccomanda l'utilizzo di formalina tamponata a ph 7 con Sali di iodio o potassio, secondo la formula di Lilie, al 10%. Non è adeguato materiale fissato in formalina non tamponata, in Buin, in Holland o in fissativi a base di acidi (es. ac. Osmico), in quanto sono sostanze che determinano la formazione di crosslink nel tessuto, rendendolo indigeribile.

Identificazione dei campioni

Identificare i contenitori con nome e cognome paziente e data di nascita e indicare la tipologia di materiale.

	Istruzione operativa	Codice Aziendale
	HPV genotyping Allegato 2 Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici	Pag. 1 di. 3
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	Ed.3 Rev.1
		22/12/2015

Gruppo di redazione: Francesca Carozzi, Simonetta Bisanzi, Cristina Sani.

1. SCOPO

Definire le modalità di conservazione dei campioni per l'estrazione del DNA per la ricerca e tipizzazione del Papillomavirus umano (HPV) in base alla stabilità per tipo di campione biologico.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione operativa deve essere applicata dal personale della S.S. Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare impegnato nella procedura di Ricerca e tipizzazione del Papilloma virus umano (HPV) con amplificazione genica.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

Fase preanalitica: modalità di conservazione e pretrattamento dei campioni biologici per ottimizzare il campione per l'estrazione del DNA. L'estrazione del DNA rappresenta un step fondamentale necessario per poter eseguire la Genotipizzazione HPV.

La Fase preanalitica viene descritta per tipologia di materiale e/o prelievo.

- Materiale cervicale prelevato in THIN PREP

Per l'estrazione del DNA, il campione è stabile per 6 settimane dalla data del prelievo (42 giorni) secondo le indicazioni del produttore.

Al 42° giorno il campione deve essere stoccatto e pellettato: agitare bene il campione, prelevare 3,0ml di TP e aliquotarli in due provette da 2ml, centrifugare a 14000 rpm per 5 minuti, eliminare il surnatante, lavare con 500 microlitri di PBS, centrifugare a 14000 rpm per 5 minuti, eliminare il surnatante e unire le due provette risospendendo in 200 microlitri di PBS. Congelare a -20°C. Identificare il campione stoccatto con numero di registro HPV e codice donna.

- Campione in STM fresco

Per l'estrazione del DNA, il campione in STM è stabile a temperatura ambiente per 14 giorni dal prelievo, dal 15° al 21° giorno +4°C, dal 22° giorno dal prelievo deve essere conservato a -20°C ; possono essere effettuate aliquote da 200 microlitri. Identificare il campione stoccatto con numero di registro HPV e codice donna.

- Materiale cellulare strisciato sui vetrini

Se il vetrino è fissato e/o colorato: non ci sono problemi di stabilità.

Se il materiale su vetrino arriva non fissato, procedere immediatamente ad una fissazione con citofix o immersione in alcool assoluto per 30 min.

- Urine

- se prelievo effettuato con conservante (ad es.PreservCyt, TP, Surepath o altro) e l'estrazione non viene eseguita entro 7 giorni, è necessario procedere con il pretrattamento* del campione e lo stoccaggio a -20°C.

Istruzione operativa	Codice Aziendale
HPV genotyping Allegato 2 Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici	Pag. 2 di. 3 Ed.3 Rev.1
S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

- se prelievo senza conservante è necessario procedere giornalmente con il pretrattamento* e lo stoccaggio a -20°C.

*** Pretrattamento e stoccaggio urina a -20°C**

1. Trasvasare l'urina in un tubo da 50ml (o due tubi falcon a seconda del volume) e centrifugare 10 minuti a 2000 rpm
2. Eliminare il sovranatante
3. Aggiungere al pellet nella falcon 500 µl di PBS (ripetere anche con l'altro eventuale falcon) e poi trasferire in due provette (tipo eppendorf) con tappo a vite da 1.5ml e centrifugare per 5 minuti a 14000 rpm
4. eseguire un lavaggio in PBS: eliminare il sovranatante, aggiungere 1ml di PBS, centrifugare per 5 minuti a velocità 14000 rpm)
5. Eliminare il sovranatante. Risospingere in 100 µl di PBS e agitare bene
6. Congelare le due provette a -20°C. Da una delle provette verrà eseguita l'estrazione, l'altra provetta servirà se necessario ripetere l'estrazione.
7. Identificare il campione stoccati con numero di registro HPV e codice ISPO

Al momento dell'estrazione ripartire dal punto 3.14) 'Estrazione da URINA stoccati in 100µl di PBS a -20°C ' del protocollo di estrazione (Istruzione operativa "estrazione DNA", allegato 5) aggiungendo la proteinasi K, oppure procedere con l'estrazione automatica con qiasymphony (allegato 29).

- Sperma

Se l'estrazione non può essere eseguita immediatamente all'arrivo del campione in laboratorio occorre procedere con il pretrattamento del campione: omogeneizzare accuratamente il campione e stoccare 4 aliquote da 200 microlitri a -20°C.

Identificare il campione stoccati con numero di registro HPV e codice ISPO e n° aliquota.

Al momento dell'estrazione ripartire dal punto 2 del protocollo di estrazione per lo sperma (punto f, dell'Istruzione Operativa allegato 3 'Estrazione del DNA'), dopo aver fatto scongelare il campione, oppure procedere con l'estrazione automatica con qiasymphony (allegato 29).

- SCRAPING in Thin Prep

Il campione in TP è stabile per 42 giorni dalla data del prelievo, quindi l'estrazione è eseguibile nella routine settimanale o bisettimanale; per periodi di tempo superiori alle due settimane si procede comunque al pretrattamento del campione :

1. Agitare bene il barattolo del thin prep contenente la spatolina usata per il prelievo
2. Trasvasare tutto il campione (tranne la spatolina) in una provetta da 50ml e centrifugare per 10 minuti a 2000 rpm
3. Eliminare il sovranatante per rovesciamento e trasferire il pellet cellulare in una provetta con tappo a vite recuperandolo con 1ml di PBS
4. centrifugare per 5 minuti a 14000rmp e eliminare il sovranatante
5. Fare un lavaggio aggiungendo 1.5 ml di PBS, centrifugare per 5 minuti a 14000rpm e eliminare il sovranatante.

	Istruzione operativa	Codice Aziendale
	HPV genotyping Allegato 2 Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici	Pag. 3 di 3
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	Ed.3 Rev.1
		22/12/2015

6. Aggiungere al pellet 500 ul di etanolo
7. centrifugare per 5 minuti a 8000 rpm
8. eliminare il surnatante per rovesciamento e poi lasciare asciugare su carta assorbente
9. Valutare la quantità del materiale cellulare (+++, ++, +, +-;+-)
10. Mettere ad evaporare il pellet cellulare per 5 minuti in stufa a 70°C
11. Identificare il campione stoccati con numero di registro HPV e codice ISPO
12. conservare a -20°C

Al momento dell'estrazione ripartire dal punto 12 del protocollo estrazione paragrafo 3.3, specifico per **campioni di SCRAPING conservati in Thin Prep** per campioni aggiungendo buffer ATL (Istruzione operativa "estrazione DNA" allegato 5); oppure procedere con l'estrazione automatica con qiasymphony (allegato 29).

- Tessuto/biopsia fresco, in soluzione fisiologica o in formalina

Il tessuto fresco deve essere trattato ed estratto in giornata, se non possibile deve essere immediatamente congelato a -80°C fino al momento della disgregazione meccanica.

La disgregazione meccanica, mediante bisturi sterile. Tale operazione andrà effettuata su un vetrino. Il tessuto sminuzzato verrà trasferito in una provetta che potrà essere congelato immediatamente a -80°C o estratto, aggiungendo direttamente la proteinasi K alla provetta.

Il tessuto in fisiologia può essere trattato allo stesso modo del tessuto fresco.

- Tessuto/biopsia fissato in formalina ma non incluso in paraffina

Il tessuto in formalina non necessita di pretrattamento; può essere estratto nella routine settimanale.

- Fettine (10 micron o similari) di tessuto/biopsie fissato in formalina ed incluso in paraffina apposte su vetrino

Il Dna dalle fettine tagliate deve essere estratto il prima possibile, comunque massimo entro 10 giorni dalla preparazione.

Per tempi superiori a 10 giorni occorre mettere i vetrini nelle scatole grigie porta vetrini, metterle in un nylon e chiudere sotto vuoto la scatola.

Scraping orale in STM

Si seguono le stesse modalità di conservazione dei campioni cervicali.

- Saliva

Procedere con l'estrazione del DNA subito all'arrivo del campione.

MODULO DI NON CONFORMITA' di Laboratorio

ISPO-LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE Genotipizzazione HPV

DATA:

DATI di chi compila il modulo

Cognome	Nome

DATI CAMPIONE

N° HPV progressivo	Data prelievo
Codice Paziente	Data Accettazione

NON CONFORMITA' DI LABORATORIO RISCONTRATE

deteriorato	Descrizione:
non corrispondenza scheda - campione	Descrizione:
incongruenza campione - esame	Descrizione:
quantità insufficiente	Descrizione:
campione non idoneo	Descrizione:
altro (specificare)	Descrizione:

Data inserimento risposta 5 (non valutabile) in nute	
Sigla Biologo	

Gruppo di redazione: Francesca Carozzi, Cristina Sani, Simonetta Bisanzi

1. SCOPO

Lo scopo del presente documento è esplicitare e rendere note, a tutti gli operatori del laboratorio Regionale HPV e Biologia molecolare di ISPO coinvolti nella genotipizzazione del Papilloma virus umano (HPV) con PCR, le indicazioni e le precauzioni di buona pratica in un laboratorio che effettua analisi molecolari su campioni biologici e applica metodiche di amplificazione genica.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione si applica nell'ambito delle attività del personale del Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare del Presidio di Villa delle Rose di ISPO che esegue la genotipizzazione HPV con amplificazione genica e reverse line blot.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

INDICAZIONI E PRECAUZIONI DI BUONA PRATICA IN UN LABORATORIO MOLECOLARE:

- Per evitare contaminazioni con DNA, occorre avere aree separate per gli steps di pre e post-amplificazione, preferibilmente in stanze separate:
 1. estrazione: deve essere effettuata nella stanza specifica (n.49).
 2. preparazione master mix : da effettuarsi sotto cappa biologica nella stanza molecolare 2 (n.41).
 3. amplificazione, rilevazione e RLB: da effettuarsi nella stanza molecolare 1 (n.67).

NB: il materiale e i relativi indumenti possono passare dalle stanze da 49 a 41 a 67, ma non viceversa per evitare contaminazioni.

tutte le pipette, puntali e tubi usati nel processo di amplificazione devono essere autoclavati e monouso.

4. utilizzare puntali con filtri per evitare contaminazioni, cambiare i puntali tra campioni e miscele secondo le buone pratiche di laboratorio.

i reagenti di amplificazione devono essere sempre preparati in aree senza DNA (sotto cappa biologica).

5. Non miscelare reagenti appartenenti a kit con differenti numeri di lotto tutti i contenitori usati per la preparazione di soluzione del coniugato o substrato devono essere accuratamente lavati e sciacquati con acqua distillata prima del loro ri-utilizzo

6. evitare contaminazione microbica dei reagenti

7. usare puntali sterili monouso

8. le strips devono essere utilizzate una sola volta

9. non toccare le strips con le mani, usare pinzette pulite

usare una matita per marcire le strips; non usare penne ; scrivere l'id sopra la linea di controllo colorazione

10. lasciare le strips nel medesimo allocamento

11. non lasciare all'aria o esposte al calore le strisce non usate

12. asciugare completamente le strips prima della loro interpretazione

13. le strisce sviluppate e secche dovrebbe essere mantenute al buio e a temperatura ambiente

Note generali :

- leggere attentamente le schede tecniche specifiche di ciascun reagente e le relative schede di sicurezza; attenersi alle specifiche norme di sicurezza indicate per ogni sostanza e reagente che verrà utilizzato nel corso della procedura;
- Prima dell'utilizzo di qualsiasi dispositivo, reagente, kit o strumentazione leggere attentamente il manuale d'uso in tutte le sue parti e attenersi ad esse;
- Deve essere prestata la massima attenzione alla data di scadenza riportata sull'etichetta di ciascuna scatola del kit: non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza;
- deve essere verificata la data di prelievo e le modalità di conservazione e pretrattamento del campione;
- I reattivi presenti nei kit sono da considerarsi un'unità indivisibile. Non frazionare o utilizzare reattivi diversi appartenenti a kit o lotti diversi;
- Conservare i campioni biologici da testare, i DNA estratti, il controllo positivo incluso nel kit in frigoriferi separati così come i prodotti amplificati e i reattivi;
- Allestire velocemente la reazione di amplificazione a temperatura ambiente oppure lavorare in ghiaccio o su blocco di raffreddamento;
- Porre estrema attenzione nelle fasi di pipettamento, settando e l'esatta quantità di ciascun reattivo specificata nelle istruzioni. Assicurarsi in caso di campioni multipli eseguiti in un'unica tornata che le quantità della miscela totale siano esatte;
- Verificare che le pipette usate siano in perfetto stato di efficienza Per evitare la contaminazione crociata, non scambiare i tappi di bottiglie e provette;
- Indossare abbigliamento protettivo, compresi i guanti monouso, per tutta la procedura del test;
- Utilizzare puntali con filtro sterile e cambiarlo ogni volta che un volume è stato dispensato;
- Evitare contaminazioni micrliche nei reagenti;
- Pulire le superfici di lavoro con ipoclorito di sodio al 5%;
- Utilizzare materiali di laboratorio monouso sterile;
- Utilizzare tutti i dispositivi e gli strumenti di pipettaggio con cura e seguire le istruzioni del produttore per la taratura e il controllo di qualità;
- Organizzare una suddivisione degli ambienti separando la zona di estrazione, amplificazione e rivelazione; non far circolare attrezzature e consumabili (pipette, provette, puntali, etc) da un ambiente all'altro; cambiare i guanti tra i vari passaggi o più spesso se necessario; il camice da laboratorio e guanti devono essere indossati in ogni zona e rimossi prima di lasciare la zona stessa. Per chiarimenti riguardanti le buone pratiche di laboratorio, fare riferimento alle linee guida approvate CLSI MM3-A2, *Molecular diagnostics Methods for infectious diseases* (CLSI, 2006).
- Tutti i campioni dovrebbero essere maneggiati come potenzialmente pericolosi;
- Utilizzare strumenti di protezione personale: guanti e occhiali di sicurezza;
- Indossare guanti monouso nel manipolare reagenti e campioni clinici e lavarsi le mani una volta terminato il lavoro;
- Non pipettare con la bocca;

Poiché nessun metodo diagnostico conosciuto può assicurare l'assenza di qualsiasi agente infettivo, è buona norma considerare ogni campione clinico come potenzialmente infetto e trattarlo come tale; Tutti i dispositivi venuti in contatto direttamente con i campioni clinici devono essere considerati come contaminati e smaltiti come tali. In caso di fuoriuscita accidentale del campione, pulire con ipoclorito di sodio al 10%. Il materiale usato per pulire deve essere smaltito in un contenitore per residui contaminati;

- Campioni clinici, materiali e prodotti contaminati devono essere smaltiti e decontaminati I rifiuti devono essere trattati e smaltiti secondo il regolamento di istituto e comunque nel rispetto della normativa vigente;
- La mix di amplificazione e il controllo positivo possono contenere sodio azide, per evitare la formazione di gas molto tossici evitare che la sodio azide venga a contatto con acidi ; per prevenire la formazione di esplosivi nelle tubature di piombo o rame, far scorrere abbondantemente acqua dopo lo smaltimento di soluzioni contenenti sodio azide.

CAMPIONI INFETTI (HIV positivi e/o HCV positivi)

Eseguire tutti i passaggi sotto cappa.

Precauzioni

1. Doppi guanti
2. Coprimanica
3. Mascherina
4. Occhiali protettivi
5. Camice monouso oppure mettere subito a lavare il camice dopo lo stoccaggio
6. Mettere fogli di carta assorbente sotto la cappa e poi gettarlo
7. Scrivere: HIV +, HCV +, ecc sulle provette e sul registro
8. I puntali usati e altro materiale appuntito devono essere isolati in un contenitore rigido prima di gettarli nel sacco dei rifiuti
9. Le provette devono essere richiuse con il tappo e isolate nel foglio di alluminio prima di gettarle nei rifiuti
10. A fine lavoro pulire con varechina cappa e pipette

Metodica Innolipa genotyping extra:

- i. Soluzione denaturante: soluzione alcalina con EDTA; deve essere chiusa immediatamente dopo l'uso; l'esposizione prolungata all'aria ne deteriora le caratteristiche 
- ii. Soluzione di ibridazione: SSC buffer contenente Luaril solfato (SLS), deve essere preriscaldata (min 37°C max 49°C) 
- iii. Soluzione stringente: Soluzione di ibridazione: SSC buffer contenente Luaril solfato (SLS), deve essere preriscaldata (min 37°C max 49°C)

- iv. Coniugato (100x): streptoavidina marcata con fosfatasi alcalina in Tris Buffer ; deve essere diluita 1/100 nel diluente del coniugato : 2ml di soluzione di lavoro per ciascun test +2ml in eccesso per test manuali. La soluzione coniugata 'di lavoro ' è stabile per otto ore al buio a t.a.
- v. Diluente del coniugato: Buffer fosfato contenente: NaCl, Triton, stabilizzante proteico.
- vi. Substrato: BCIP e NBT in DMF; deve essere diluito 1/100 in buffer del substrato; preparare 2 ml di substrato di soluzione di lavoro per ciascun test più un eccesso di 2ml per test manuale. La soluzione coniugata 'di lavoro ' è stabile per otto ore al buio a t.a.
- vii. Buffer del substrato:  Tris buffer contenente NaCl, MgCl₂
- viii. Soluzione di lavaggio: Buffer fosfato contenente NaCl, triton e preservanti. Deve essere diluita 1/5 in acqua distillata o deionizzata prima dell'uso: preparare 8ml di soluzione di lavaggio di lavoro per ciascun test +10ml in eccesso per test manuali. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a 2-8°C.

Norme di sicurezza relative al prodotto Ampliquity HPV-type

I pericoli derivanti dall'uso di questo prodotto sono quelli associati ai singoli componenti.
Componenti pericolosi:

SOLUZIONE DEN: contiene NaOH <2%

Descrizione del pericolo: Provoca gravi ustioni

FRASI DI RISCHIO e FRASI S

R 36/37/38 Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle;

S 26

In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente ed abbondantemente con acqua e consultare un medico.

La scheda di sicurezza del kit è disponibile su richiesta.

HPV typing

Pag. 1 di 14

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

**S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE**

22/12/2015

Gruppo di redazione: Francesca Carozzi, Cristina Sani, Simonetta Bisanzi, Luciana Rossi, Nicaela Aspite, Virginia Becattini, Antonella Asta, Armelle Munnia, Paola Cifarelli

1. SCOPO

Definire le modalità di estrazione del DNA da vari tipi di campioni biologici per la ricerca e tipizzazione del Papillomavirus umano (HPV).

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione operativa deve essere applicata dal personale afferente alla S.S. Laboratorio HPV e oncologia molecolare, impegnato nella procedura di Ricerca e tipizzazione del Papilloma virus umano (HPV) con amplificazione genica.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

L'estrazione manuale del DNA viene eseguita con kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, catalog. no. 51306) (il manuale d'uso in allegato Allegato 22), seguendo i protocolli specifici per ciascuna tipologia di campione/prelievo .

I campioni devono essere opportunamente conservati e/o pretrattati prima dell'estrazione del DNA, secondo le indicazioni riportate nell'istruzione operativa "Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici per Genotipizzazione HPV, Allegato 2 della Procedura HPV typing. L'estrazione del DNA viene eseguita sotto la cappa a flusso laminare (stanza 49). Il personale impegnato nella procedura deve verificare sull'apposito calendario la manutenzione della cappa. Devono essere eseguite le fasi previste dalla check list prevenzione contaminazione (Allegato 28), che deve essere debitamente compilata.

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS) disponibili in laboratorio.

Controlli di qualità interni da inserire nella seduta di estrazione

Ad ogni singola seduta di estrazione viene inserito un controllo estrazione: campione di cellule cervicali HPV negativo (in thin prep o in STM, nel caso nella seduta non siano presenti campioni in TP). Questo controllo serve sia per la verifica dell'idoneità della procedura di estrazione sia come controllo negativo da HPV.

Preparazione controllo estrazione.

Si prepara un pool di campioni negativi (campioni screening in TP o in STM), si testa per 3 volte in estrazione e tipizzazione a conferma della negatività e, se confermato HPV negativo, si aliquota nella quantità necessaria ad una estrazione e si conserva idoneamente (TP a temperatura ambiente, STM a - 20°C) per l'utilizzo per un lungo periodo.

I controlli devono seguire lo stesso iter dei campioni.

HPV typing

Pag. 2 di 14

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

**S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE**

22/12/2015

Nel caso di seduta di estrazione per un solo campione o pochi campioni fuori della seduta di estrazione settimanale (se arriva per esempio una biopsia), si estraе insieme al campione un bianco estrazione, cioè un controllo senza campione. Questo bianco estrazione si sottopone a PCR Gp5+/6+ home made con primer biotinilati e si verifica la negatività su gel.

3.1) Estrazione del DNA da campioni cervicali in STM (stoccato a -80°C)

Il DNA genomico e virale viene estratto partendo da 100ul di campione in STM mediante QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

1. Scongelare a Temperatura Ambiente 100ul
2. aggiungere 200µl di AL e 20µl di proteinasi K
3. trasferire il tutto in una provetta con tappo a vite (se precedentemente stoccati in provette fondo piatto).
4. agitare col vortex e incubare a 56°C per almeno 30 minuti
5. durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
6. centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE per tutti i materiali conservati a -80°C (3.4).

3.2) Estrazione del DNA da campioni non cervicali in STM (stoccato a -80°C) o campioni cervicali in cui è segnalata una scarsa cellularità

Il DNA genomico e virale viene estratto partendo da 200ul di campione in STM mediante QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

1. scongelare a Temperatura Ambiente 200ul
2. aggiungere 200µl di AL e 20µl di proteinasi K
3. trasferire il tutto in una provetta con tappo a vite (se precedentemente stoccati in provette fondo piatto)
4. agitare col vortex e incubare a 56°C per almeno 30 minuti
5. durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
6. centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE per tutti i materiali conservati a -80°C (3.4).

3.3) Estrazione materiale cervico-vaginale prelevato in THIN PREP, pretrattato e a -80°C

Quantità di materiale da utilizzare per l'estrazione:

Se materiale stoccatto a partire da 1.5 cc cellulare in Thin-Prep, utilizzare 1 provetta congelata per ciascun paziente (vedi Istruzione Operativa Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici per Genotipizzazione HPV, Allegato 2 della Procedura Genotipizzazione HPV).

1. Scongelare rapidamente a 37°C e tenere in ghiaccio fino all'inizio della procedura (da protocollo Qiagen Purificazione di DNA da cellule in cultura o cellule in sospensione)
2. centrifugare per 5 minuti a 8000rpm

HPV typing

Pag. 3 di 14

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

3. eliminare il surnatante con un puntale da 1000 µl, nel caso il pellet si veda poco, usare alla fine una pipetta da 100 µl per non portare via il materiale e lasciare al max 50 µl di liquido
4. aggiungere al pellet 180µl di Buffer ATL (se ha i cristalli, scioglierli a 56°C per 2 minuti)
5. aggiungere a ciascuna provetta 20µl di Proteinasi K e coprire con parafilm, se non si sono usate provette safe lock o con tappo a vite
6. miscelare col vortex e incubare a 56°C per 1 ora
Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato
7. centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
8. aggiungere 200µl di AL (pronto per l'uso), miscelare, vortexare bene per 15 secondi
9. Incubare a 70°C per 10 minuti.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE per tutti i materiali conservati a -80°C (3.4).

3.4 Procedura comune di estrazione per tutti i materiali conservati a -80°C (protocolli 3.1-3.3)

I protocolli descritti nei paragrafi da 3.1 a 3.3, così come presentati nella presente istruzione operativa, ripartono da questo punto

1. Durante l'incubazione a 56°C, montare, per ciascun campione da estrarre una colonna sul relativo supporto fornito nel kit
2. Aggiungere 200µl di etanolo assoluto per campione, vortexare per 15 sec e spinnare per recuperare l'eventuale materiale andato nel tappo
3. Trasferire il tutto, compreso l'eventuale precipitato, nella colonna preparata nel punto 1
4. Centrifugare per 2 minuti a 8000rpm
5. Eliminare la provetta col filtrato e porre la colonna con il filtro su un nuovo supporto
6. Aprire delicatamente la colonna ed aggiungere 500 µl di Buffer AW1
7. Centrifugare 2 minuti a 10.000rpm
8. Eliminare il supporto col filtrato e porre la colonna con il filtro su un nuovo supporto
9. Aprire delicatamente la colonna ed aggiungere 500 µl di Buffer AW2
10. Centrifugare 4 minuti alla massima velocità (14.000rpm, 20.000g)
11. Mettere a scaldare il Buffer di eluizione AE nell'incubatore a 70°C
12. Scartare il liquido dal supporto, rimettere la colonna sullo stesso supporto e fare un'altra centrifugata a 14.000rpm per 1 minuto. In questo modo si elimina ogni residuo di buffer AW2
13. Eliminare il supporto col filtrato
14. Porre la colonna con il filtro in una eppendorf da 1,5ml
15. Aprire lentamente la colonna ed eluire con 100µl di Buffer di eluizione AE precedentemente riscaldato a 70°C. Il calore è fondamentale nella rottura dei legami del DNA con la resina della colonna
16. Incubare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti e poi centrifugare a 10.000rpm per 2 minuti

HPV typing

Pag. 4 di 14

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

17. PER OTTENERE UNA MAGGIORE RESA, fare una doppia eluizione: ripassare nella stessa colonna i 100 microlitri eluiti al punto 21), incubando 1 minuto a Temperatura Ambiente e centrifugando poi come sopra.
 Dosare la concentrazione del DNA estratto allo spettrofotometro diluizione 1:10 (5 μ l campione in 45 μ l AE).
 Conservare il DNA estratto a -20°C .

3.5) Estrazione DNA da campioni cervicali in STM (fresco)

Il DNA genomico e virale viene estratto partendo da 100ul di campione in STM mediante QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). Per i campioni con richiesta medica e quindi genotipizzati con Ampliquality HPV type express, l'estrazione del DNA è da 200ul di campione in STM.

1. Prelevare 100ul di campione (o 200ul per i campioni di routine) e dispensarli in una provetta con tappo a vite da 1.5ml
2. aggiungere 200 μ l di AL e 20 μ l di proteinasi K
3. trasferire il tutto in una provetta con tappo a vite (se precedentemente stoccati in provette fondo piatto)
4. agitare col vortex e incubare a 56°C per almeno 30 minuti
5. durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
6. centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).

3.6) Estrazione DNA da campioni non cervicali in STM (fresco)

Il DNA genomico e virale viene estratto partendo da 200ul di campione in STM mediante QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

1. Prelevare 200ul di campione e dispensarli in una provetta con tappo a vite da 1.5ml
2. aggiungere 200 μ l di AL e 20 μ l di proteinasi K
3. trasferire il tutto in una provetta con tappo a vite (se precedentemente stoccati in provette fondo piatto)
4. agitare col vortex e incubare a 56°C per almeno 30 minuti
5. durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
6. centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).

3.7) Estrazione DNA da materiale cervico-vaginale prelevato in THIN PREP

Mescolare vigorosamente il materiale

1. Dispensare con pipetta pasteur sterile 1.5 ml di campione in una provetta da 1.5ml con tappo a vite
2. Centrifugare 5 minuti a 14.000rpm
3. Eliminare il surnatante per rovesciamento

HPV typing

Allegato 5

Pag. 5 di 14

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

4. Aggiungere 1,5 ml di PBS
5. Centrifugare 5 minuti a 14.000rpm
6. Eliminare il surnatante per rovesciamento
7. Aggiungere al pellet 500 µl di etanolo assoluto
8. Centrifugare per 5 minuti a 8000rpm
9. Eliminare il surnatante per rovesciamento e poi lasciare asciugare su carta assorbente
10. Valutare la quantità del materiale cellulare
11. Mettere ad evaporare il pellet cellulare per 5 minuti in blocco termostatato a 70°C
12. Aggiungere 180µl di Buffer ATL (se ha i cristalli, scioglierli a 56°C per 2 minuti)
13. Aggiungere a ciascuna provetta 20µl di Proteinasi K stock solution
14. Miscelare col vortex e incubare a 56°C per almeno 1 ora.
Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato
15. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
16. Aggiungere 200µl di AL, miscelare con vortex bene per 15 secondi
17. Incubare 10 minuti a 70°C.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).

3.8) Estrazione del DNA da campioni strisciato sui vetrini (cervico-vaginali o altro materiale cellulare)

- 3.8.1 Vetrini COLORATI

- a) Smontaggio dei vetrini:

- *Vetrini con coprioggetto di vetro:* smontaggio in xilolo per diversi giorni; una volta tolto il coprioggetto lasciarli in xilolo per altri 10 minuti in modo da togliere ogni traccia del montante.
- *Vetrini con pellicola:* smontare i vetrini in acetone per 3 minuti; la pellicola si staccherà facilmente con l'ausilio di una pinza. Mettere i vetrini in xilolo per 10 minuti per eliminare ogni residuo di pellicola.

- b) Decolorazione

- Decolorare il vetrino in una miscela di HCL 1% preparata nel modo seguente:
99 ml di alcool etilico al 70% + 1ml di HCL 37% per un periodo di tempo necessario a far decolorare il materiale.

- c) Decolorare per 5-20 minuti, dipende dal vetrino
(per chi non ha esperienza lasciare 20 minuti).

La decolorazione non deve comunque mai superare i 20 minuti (il materiale cellulare altrimenti si degrada).

- d) Lavare il vetrino in acqua corrente per 10 minuti.
- e) Lasciar asciugare a temperatura ambiente per 10 minuti (eventualmente anche in stufa a 37°C).

HPV typing

Pag. 6 di 14

Allegato 5

Ed. 3 Rev.1

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

22/12/2015

**S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE**

f) Disidratazione negli alcool crescenti:

- alcool 50% per 1 minuto
- alcool 80% per 1 minuto
- alcool 100% per 10 minuti.

3.8.2 Vetrini FISSATI MA NON COLORATI

- Immergere i vetrini in alcool assoluto per 30 minuti, per eliminare ogni residuo di pellicola, dopo averli identificati con lapis nell'appositi spazio sul vetrino.

Da questo punto i vetrini decolorati o vetrini non colorati seguono la stessa procedura:

Preparare per ciascun campione una provetta da 1.5ml con tappo a vite, una provetta tipo eppendorf con 500ul di etanolo assoluto e una pipetta pasteur sterile.

Grattare le cellule dal vetrino con un altro vetrino pulito.

Recuperare le cellule così grattate con i 500ul di etanolo e metterle nella provetta con tappo a vite.

Centrifugare per 5 minuti a 8000rpm.

Eliminare il sovranatante per rovesciamento e mettere la provetta a sgocciolare su foglio di carta assorbente.

Valutare la quantità di materiale cellulare.

Mettere a evaporare per 5 minuti a 70°C nel blocco termostatato le provette senza tappo.

Aggiungere al pellet 180ul di Buffer ATL (se ha i cristalli, scioglierli a 56°C per 2 minuti).

Aggiungere a ciascuna provetta 20ul di Proteinasi K.

Miscelare col vortex e incubare a 56°C per almeno 1 ora.

Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA.

Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato.

Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo.

Aggiungere 200ul di AL miscelare con il vortex bene per 15 secondi.

Incubare a 70°C per 10 minuti.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).**3.9 Estrazione da URINA**

1. travasare tutta l' urina in un tubo falcon e centrifugare 10 minuti a 2000rpm
2. eliminare il sovranatante per rovesciamento, recuperare il pellet con 500ul di PBS e trasferirlo in una provetta con tappo a vite da 1.5ml
3. eseguire due lavaggi in PBS (1ml di PBS, centrifugazione per 5 minuti a velocità 14000rpm)
4. aggiungere al pellet 180ul di Buffer ATL (se ha i cristalli, scioglierli a 56°C per 2 minuti).
5. aggiungere a ciascuna provetta 20ul di Proteinasi K
6. miscelare, agitare col vortex e incubare a 56°C per 1 ora.

Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA.

Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato.

7. centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
8. aggiungere 200ul di AL, miscelare, vortexare bene per 15 secondi

HPV typing

Pag. 7 di 14

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

**S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE**

22/12/2015

9. incubare a 70°C per 10 minuti.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).

3.10 Estrazione da sperma

Processare subito all'arrivo del campione

1. omogenizzare il campione con la pipetta e prelevare 200 microlitri
2. aggiungere 200 microlitri di AL e 20 microlitri di proteinasi k
(seguire protocollo qiaqen come body fluids)
3. miscelare, agitare col vortex e incubare a 56°C per 1 ora (il protocollo dice che bastano anche 10 minuti, ma che tempo maggiori non influenzano, noi facciamo sempre 1 ora)
4. durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
5. centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).

NB: tenere i campioni in frigo fino al momento dell'estrazione, se viene fatta in giornata, altrimenti procedere con il pretrattamento come riportato nell'allegato 2; prima si estraggono e migliore e' la resa.

3.11 Estrazione da campioni di SCRAPING con scarso materiale cellulare conservati in Thin Prep

1. Agitare bene il barattolo del thin prep contenente la spatolina usata per il prelievo
2. Trasvasare tutto il campione (tranne la spatolina) in una provetta da 50ml e centrifugare per 10 minuti a 2000rpm
3. Eliminare il sovraccarico per rovesciamento e trasferire il pellet cellulare in una provetta con tappo a vite recuperandolo con 1ml di PBS
4. Centrifugare per 5 minuti a 14000rmp e eliminare il sovraccarico
5. Fare un lavaggio aggiungendo 1.5 ml di PBS, centrifugare per 5 minuti a 14000rpm e eliminare il sovraccarico.
6. Aggiungere al pellet 500 ul di etanolo
7. Centrifugare per 5 minuti a 8000rpm
8. Eliminare il surnatante per rovesciamento e poi lasciare asciugare su carta assorbente
9. Valutare la quantità del materiale cellulare
10. Mettere ad evaporare il pellet cellulare per 5 minuti in stufa a 70°C
11. Aggiungere 180µl di Buffer ATL (se ha i cristalli, scioglierli a 56°C per 2 minuti)
12. Aggiungere a ciascuna provetta 20µl di Proteinasi K stock solution
13. Miscelare col vortex e incubare a 56°C per almeno 1 ora.

Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA

Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato

14. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
15. Aggiungere 200µl di AL, miscelare con vortex bene per 15 secondi
16. Incubare 10 minuti a 70°C.

HPV typing

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Pag. 8 di 14

Ed. 3 Rev.1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).

3.12 Estrazione da tessuto fresco, in soluzione fisiologica o in formalina

- 1a. Tessuto in formalina: processare il campione prima possibile; prendere un frammento del tessuto (*) e lavarlo in PBS immergeandolo 2 volte in PBS; trasferire il frammento da estrarre in una provetta da 1.5ml con tappo a vite.
- 1b. Tessuto in soluzione fisiologica: trasferire un frammento del tessuto da estrarre (*) in una provetta da 1.5ml con tappo a vite.
2. Aggiungere 180ul di ATL e 20ul di proteinasi k.
3. Agitare con il vortex.
4. Incubare a 56°C overnight, agitando con il vortex ogni tanto.
Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato.
5. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo.
6. Aggiungere 200µl di AL, miscelare con vortex bene per 15 secondi.
7. Incubare 10 minuti a 70°C.

Quindi proseguire con la procedura comune di ESTRAZIONE (3.13).

(*) L'estrazione può essere fatta da un piccolo frammento del tessuto, quindi la biopsia viene tagliata in più pezzi servendosi di bisturi sterile e i frammenti non utilizzati per l'estrazione vengono congelati a -20°C in provetta da 1.5ml senza aggiunta di nessuna soluzione.

3.13 PROCEDURA COMUNE DI ESTRAZIONE protocolli da 3.5 a 3.12

I protocolli descritti nei paragrafi da 3.3 a 3.9, così come presentati nella presente istruzione operativa, ripartono da questo punto

1. Durante l'ora di incubazione a 56°C, montare, per ciascun caso da estrarre (qualsiasi tipo di materiale), una colonna sul relativo supporto fornito nel kit.
2. Aggiungere 200µl di etanolo assoluto per campione, vortexare per 15 sec e spinolare per recuperare l'eventuale materiale andato nel tappo.
3. Trasferire il tutto, compreso l'eventuale precipitato, nella colonna preparata nel punto 1.
4. Chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto a 8.000rpm (6000g).
5. Eliminare la provetta col filtrato e porre la colonna con il filtro su un nuovo supporto.
6. Aprire delicatamente la colonna ed aggiungere 500 µl di Buffer AW1.
7. Centrifugare 1 minuto a 8.000rpm (6000g).
8. Eliminare il supporto col filtrato e porre la colonna con il filtro su un nuovo supporto.
9. Aprire delicatamente la colonna ed aggiungere 500 µl di Buffer AW2.
10. Centrifugare 3 minuti alla massima velocità (14.000rpm, 20.000g).
11. Mettere a scaldare il Buffer di eluizione AE nell'incubatore a 70°C.
12. Scartare il liquido dal supporto, rimettere la colonna sullo stesso supporto e fare un'altra centrifugata a 14.000rpm per 1 minuto. In questo modo si elimina ogni residuo di buffer AW2.

13. Eliminare il supporto col filtrato.
14. Porre la colonna con il filtro in una eppendorf safe lock da 1,5ml. Aprire lentamente la colonna ed eluire con 80-100µl di Buffer di eluizione AE precedentemente riscaldato a 70°C. Il calore è fondamentale nella rottura dei legami del DNA con la resina della colonna.
16. Incubare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti e poi centrifugare a 8.000rpm per 1 minuto.
17. PER OTTENERE UNA MAGGIORE RESA, per i campioni con scarso materiale, FACCIAMO UNA DOPPIA ELUIZIONE: si fanno ripassare nella stessa colonna i 100 microlitri eluiti al punto 15), incubando 1 minuto a TA e centrifugando poi come sopra.

3.14) Estrazione da URINA stoccata in 100µl di PBS a – 20°C

1. Scongelare i campioni a temperatura ambiente
2. Aggiungere a ciascuna provetta 20µl di Proteinasi K (vortexare)
3. Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di Buffer AL e coprire con parafilm se non si sono usate provette safe lock o con tappo a vite
4. Miscelare col vortex e incubare a 56°C per 30 minuti
Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA.
Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato
5. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
6. Incubare a 70°C per 10 minuti
7. Aggiungere 200µl di etanolo 100% (pronto per l'uso), miscelare, vortexare bene per 15 secondi. Centrifugare brevemente
8. Pipettare il contenuto della provetta da centrifugazione nella colonnina QIAamp Spin Column e centrifugare per 2 min a 8000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube
9. Aggiungere 500µl di Buffer AW1 e centrifugare 2 min a 10000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube
10. Aggiungere 500µl di Buffer AW2 e centrifugare 4 min a 13000rpm (mettere il Buffer AE a scaldare a 70°C)
11. Aggiungere da 80 a 100µl di Buffur AE in base al pellet e lasciare riposare 5 minuti
Centrifugare 2 min a 10000rpm (Doppia eluizione)

3.15) Estrazione da frammenti di tessuto fissato ed incluso in paraffina

E' necessario procedere con la rimozione della paraffina e alla digestione del campione.

Viene descritto qui il metodo di deparaffinazione Senza utilizzo di xilolo.

L'estrazione del DNA viene eseguita con kit QIAamp DNA FFPE tissue (Qiagen, catalog no. 56404) (il manuale d'uso in allegato 23).

1. Deporre una fettina di tessuto paraffinato in una provetta sterile (con tappo da avvitare).
2. Preriscaldare a 120°C il termoblock e lasciare per 20 minuti la provetta (senza tappo) nel termoblock.
3. Lavaggi con etanolo:
1° lavaggio:
- aggiungere 1 ml di etanolo 100% nella provetta e vortexare brevemente.

HPV typing

Pag. 10 di 14

Allegato 5

Ed. 3 Rev.1

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

22/12/2015

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

- centrifugare per 5 minuti a 14000rpm a temperatura ambiente e successivamente rimuovere il sovranatante senza toccare la pellet.

2° lavaggio:

- aggiungere 1 ml di etanolo 100% nella provetta e vortexare brevemente.

- centrifugare per 2 minuti a 14000rpm a temperatura ambiente e successivamente rimuovere il sovranatante senza toccare la pellet.

4. Lasciare aperta la provetta e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente per far evaporare l'etanolo rimasto.

5. Successivamente incubare per 15 minuti nel termoblock a 37°C sempre lasciando aperta la provetta (la pellet deve asciugarsi completamente).

6. Risospendere la pellet in 180 µl di Buffer ATL.

7. Aggiungere 20 µl di proteinase K e vortexare.

8. Incubare a 56°C overnight.

9. Al termine dell'incubazione togliere i campioni dal termoblock e impostare la temperatura a 90°C. Quando il termoblock ha raggiunto 90°C incubare i campioni per 1 ora.

10. Centrifugare brevemente.

11. Aggiungere 200 µl di Buffer AL e vortexare brevemente.

12. Aggiungere 200 µl di etanolo (100%) e vortexare.

13. Centrifugare brevemente.

14. Trasferire delicatamente tutto il lisato nella colonnina QIAamp MinElute (in un tubo da 2 ml) e centrifugare a 8000rpm per 1 minuto.

15. Gettare il tubo con l'eluato e trasferire la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.

16. Aggiungere 500 µl di Buffer AW1 nella colonnina e centrifugare a 8000rpm per 1 minuto.

17. Gettare il tubo con l'eluato e trasferire la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.

18. Aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare a 8000rpm per 1 minuto.

19. Gettare il tubo con l'eluato e trasferire la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.

20. Centrifugare a 14000rpm per 3 minuti.

21. Trasferire la colonnina in una nuova provetta, aggiungere 100 µl di Buffer ATE al centro della membrana e incubare per 5 minuti.

22. Al termine dell'incubazione centrifugare per 1 minuto a 14000rpm.

3.16) estrazioni campioni studio NTCC Materiale prelevato in THIN PREP e stoccatto a -80°C

Quantità di materiale da utilizzare per l'estrazione:

Se materiale stoccatto a partire da 1 cc cellulare in Thin-Prep, utilizzare 1 provetta congelata per ciascun paziente

1. Scongelarli a temperatura ambiente
2. centrifugare per 5 minuti a 12000rpm
3. eliminare il surnatante con un puntale da 1000 µl, nel caso il pellet si veda poco usare alla fine una pipetta da 100 µl per non portare via il materiale e lasciare al max 50 µl di liquido
4. Decantare e risospendere in 100 µl di PBS
5. Aggiungere a ciascuna provetta 20µl di Proteinasi K, (vortexare)

HPV typing

Pag. 11 di 14

Allegato 5

 Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

 S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

6. Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di Buffer AL e coprire con parafilm se non si sono usate provette safe lock o con tappo a vite
7. Miscelare col vortex e incubare a 56°C per 30 minuti.
Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA.
Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato
8. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
9. Aggiungere 200µl di etanolo 100% (pronto per l'uso), miscelare, vortexare bene per 15 secondi.
Centrifugare brevemente
10. Incubare a 70°C per 10 minuti
11. Pipettare il contenuto della provetta da centrifugazione nella colonnina QIAamp Spin Column e centrifugare per 2 min a 2000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube.
12. Aggiungere 500µl di Buffer AW1 e centrifugare 2 min a 10000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube.
13. Aggiungere 500µl di Buffer AW2 e centrifugare 4 min a 13000rpm (mettere il Buffer AE a scaldare a 70°C)
14. Aggiungere da 80 a 100µl di Buffer AE in base al pellet e lasciare riposare 5 minuti
15. Centrifugare 2 min a 10000rpm (Doppia eluizione).
16. Dosare allo spettrofotometro diluizione 1:100.

3.17) Estrazione Campioni studio NTCC in STM stoccato a -80°C

1. Scongelarli a temperatura ambiente
2. Prelevare 100 µl e riportare a -80 °C i 100 µl che rimangono
3. Aggiungere a ciascuna provetta 20µl di Proteinasi K (vortexare)
4. Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di Buffer AL e coprire con parafilm se non si sono usate provette safe lock o con tappo a vite
5. Miscelare col vortex e incubare a 56°C per 30 minuti.
Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA.
Alla fine dell'incubazione, controllare che il materiale sia lisato
6. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
7. Aggiungere 200µl di etanolo 100% (pronto per l'uso), miscelare, vortexare bene per 15 secondi.
Centrifugare brevemente
8. Incubare a 70°C per 10 minuti
9. Pipettare il contenuto della provetta da centrifugazione nella colonnina QIAamp Spin Column e centrifugare per 2 min a 2000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube
10. Aggiungere 500µl di Buffer AW1 e centrifugare 2 min a 10000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube
11. Aggiungere 500µl di Buffer AW2 e centrifugare 4 min a 13000rpm (mettere il Buffer AE a scaldare a 70°C)
12. Aggiungere da 100µl di Buffer AE in base al pellet e lasciare riposare 5 minuti
13. Centrifugare 2 min a 10000rpm (Doppia eluizione)
14. Dosare allo spettrofotometro diluizione 1:100.

HPV typing
Allegato 5

Pag. 12 di 14

 Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

 S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

- Se richiesto, dosare la concentrazione del DNA estratto allo spettrofotometro diluizione 1:10 (5 µl campione in 45 µl AE).
- Conservare il DNA estratto a -20°C.

3.18) Protocollo di estrazione DNA da Campione in STM denaturato

Prelevare 200ul di campione in STM denaturato dopo averlo agitato per qualche minuto sul blocco per l'HC2 e metterlo in una provetta con tappo a vite.

15. Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di Buffer AL (vortexare)
16. Aggiungere 20µl di Proteinasi K
17. Agitare col vortex e incubare a 56°C per 1 ora (il protocollo dice che bastano anche 10 minuti, ma tempi maggiori non influenzano, noi facciamo sempre 1 ora)
18. Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA
19. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo
20. Incubare a 70°C per 10 minuti
21. Aggiungere 200µl di etanolo 100% (pronto per l'uso), vortexare bene per 15 secondi. Centrifugare brevemente
22. Pipettare il contenuto della provetta da centrifugazione nella colonnina QIAamp Spin Column e centrifugare per 1 min a 8000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube
23. Aggiungere 500µl di Buffer AW1 e centrifugare 1 min a 8000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube
24. Aggiungere 500µl di Buffer AW2 e centrifugare 3 min a 14000rpm (mettere il Buffer AE a scaldare a 70°C)
25. Fare una centrifugata a vuoto per 1 minuto a 14000rpm
26. Aggiungere 100µl di Buffur AE e lasciare riposare 5 minuti
27. Centrifugare 1 min a 8000rpm (Doppia eluizione).

3.19) Protocollo di estrazione DNA da Campione in STM denaturato con aggiunta di MES 2-[morpholino]ethanesulfonic acid

Prelevare 150ul di campione in STM denaturato dopo averlo agitato per qualche minuto sul blocco per l'HC2 e metterlo in una provetta con tappo a vite.

1. Aggiungere 50µl di soluzione neutralizzante^a costituita da 0.2M MES e 1M acido acetico in rapporto 9:1
2. Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di Buffer AL (vortexare)
3. Incubare a 70°C per 10 minuti
4. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere le gocce dal tappo
5. Aggiungere 200µl di etanolo 100% (pronto per l'uso), vortexare bene per 15 secondi. Centrifugare brevemente
6. Pipettare il contenuto della provetta da centrifugazione nella colonnina QIAamp Spin Column e centrifugare per 1 min a 8000rpm. Mettere la colonnina su un altro collection tube

HPV typing

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Pag. 13 di 14

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE

Ed. 3 Rev.1

22/12/2015

7. Aggiungere 500 μ l di Buffer AW1 e centrifugare 1 min a 8000rpm. Mettere la colonna su un altro collection tube
8. Aggiungere 500 μ l di Buffer AW2 e centrifugare per 3 min a 14000rpm (mettere il Buffer AE a scaldare a 70°C)
9. Fare una centrifugata a vuoto per 1 minuto a 14000rpm
10. Aggiungere 100 μ l di Buffer AE e lasciare riposare 5 minuti
11. Centrifugare 1 min a 8000rpm (Doppia eluizione).

^a Preparazione soluzione neutralizzante:

1) preparazione di 0.2M MES:

200ul MES 1M + 800ul H2O = **1ml 0,2M MES**

2) preparazione di 1M acido acetico

Acido acetico : 99%

PM = 60.05

$d = (1,05 \text{ g/ml}) \times 1000 = 1050 \text{ g/l}$

$M = d \times (\% / 100) \times 1/PM$

$M = 1050 \times 0,99\% \times 0,0166 = 17,25\text{M}$

1M acido acetico = 10ul 99% acido acetico + 162,5ul H2O = **172,5ul 1M acido acetico**

SOLUZIONE NEUTRALIZZANTE (per ciascun campione):

49ul 0,2M MES + 1ul 1M acido acetico = 50 ul

3.20) Protocollo di estrazione da saliva

Prelevare 200ul di campione e metterlo in una provetta con tappo a vite.

28. Aggiungere a ciascuna provetta 200 μ l di Buffer AL (vortexare)

29. Aggiungere 20 μ l di Proteinasi K

30. Agitare col vortex e incubare a 56°C per 1 ora (il protocollo dice che bastano anche 10 minuti, ma tempi maggiori non influenzano, noi facciamo sempre 1 ora)

31. Durante l'incubazione agitare col vortex OGNI 15 MINUTI CIRCA

32. Centrifugare brevemente (spin) per rimuovere gocce dal tappo

33. Aggiungere 200 μ l di etanolo 100% (pronto per l'uso), vortexare bene per 15 secondi. Centrifugare brevemente

34. Pipettare il contenuto della provetta da centrifugazione nella colonna QIAamp Spin Column e centrifugare per 1 min a 8000rpm. Mettere la colonna su un altro collection tube

35. Aggiungere 500 μ l di Buffer AW1 e centrifugare 1 min a 8000rpm. Mettere la colonna su un altro collection tube

36. Aggiungere 500 μ l di Buffer AW2 e centrifugare 3 min a 14000rpm (mettere il Buffer AE a scaldare a 70°C)

37. Fare una centrifugata a vuoto per 1 minuto a 14000rpm

HPV typing

Pag. 14 di 14

Allegato 5

Estrazione manuale DNA da
campioni biologici

Ed. 3 Rev.1

**S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV
E BIOLOGIA MOLECOLARE**

22/12/2015

38. Aggiungere 100 μ l di Buffur AE e lasciare riposare 5 minuti
39. Centrifugare 1 min a 8000rpm
40. Doppia eluizione: rimettere l'eluato nella colonna, aspettare 1 minuto e centrifugare per 1 minuto a 8000rpm.

Allegati da consultare

- Allegato 22 - QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook

For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots, body fluids, cultured cells, swabs, and tissue.

- Allegato 23 - QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook

For purification of genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

- Allegato 28 "check list prevenzione contaminazione da HPV".

Stumentazione

Centrifuga

Vortex

Cappa a flusso laminare

Incubatore a secco.