 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 1 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

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

1. SCOPO

Definire la modalità di Genotipizzazione dei Papillomavirus umani (HPV) con PCR single step (PCR) e reverse line blot (RLB).

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione operativa deve essere applicata dal personale della S.S. Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare o operante all'interno di essa, coinvolto e/o responsabile delle attività afferenti alla procedura Genotipizzazione del Papilloma virus umano (HPV) con amplificazione genica.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

IDENTIFICAZIONE E TIPIZZAZIONE HPV MEDIANTE PCR SINGLE STEP E REVERSE LINE BLOT CON AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v.3.0 AB ANALITICA (Ab analitica, cod. 03-35A)

(tra gli allegati il manuale d'uso Allegato 19)

Principi del metodo

La strategia di *screening* adottata in questo kit prevede un'amplificazione nella regione **L1** del genoma virale con *primer* biotinilati.

La regione L1 risulta particolarmente conservata e permette di rilevare, mediante l'utilizzo di una coppia di *primer consensus*, la presenza di un elevato numero di genotipi virali (Karlsen F et al., 1996).

Questo metodo può essere applicato a DNA estratto da materiale citologico (tampone cervico-vaginale, cellule del cavo orale, tampone uretrale, liquido seminale) o da campioni di tipo istologico (biopsie fresche, congelate o fissate in formalina neutra tamponata ed incluse in paraffina).

Il prodotto amplificato biotinilato viene tipizzato mediante ibridazione inversa allele-specifica su strip.


Il kit consente di valutare l'idoneità del DNA estratto mediante l'amplificazione (con *primer* biotinilati) del gene TST (*thiosulfate sulfurtransferase rhodanese*) in multiplex con quella del target virale. Un risultato negativo per l'amplificazione di questo gene di controllo indica la presenza di inibitori della reazione di amplificazione o di DNA degradato nell'estratto.

Nel kit viene fornito come **controllo positivo** di amplificazione e tipizzazione il DNA di **HPV 61**. Tale controllo non costituisce fonte di alcun pericolo per l'operatore, trattandosi di DNA plasmidico contenente solo una parte del genoma virale.

Il buon esito dell'amplificazione del controllo positivo (inserito all'interno della seduta di amplificazione) è garanzia del corretto funzionamento della reazione.

Per l'allestimento della reazione di amplificazione, viene fornita **un'unica mastermix pronta all'uso**, contenente tutti i reagenti necessari per l'amplificazione di HPV e del gene TST, oltre al sistema **dUTP/UNG**, che permette di prevenire le contaminazioni da precedenti amplificati, essendo in grado di rimuovere i residui di uracile incorporati in molecole di DNA a singola o doppia elica.

La metodica utilizzata in questo kit permette l'identificazione dei seguenti genotipi virali:

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 2 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68a, 68b, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90.

In ciascuna strip, inoltre, sono presenti:

- una sonda per la rivelazione dell'amplificato del gene TST, utilizzato come controllo di amplificabilità (AMPLIFICATION CONTROL).
- una Sequenza Universale HPV a cui risultano positivi anche genotipi HPV che non sono poi identificabili da una sonda specifica nella strip (UNIVERSAL HPV).

Azioni preliminari

Verificare che i campioni in esame siano stati registrati sul registro interno di laboratorio 'HPV genotipizzazioni' al momento dell'estrazione del DNA. L'esame viene eseguito infatti sul DNA estratto dai campioni in analisi (vedi Istruzione Operativa Estrazione del DNA allegato 5).

Ogni fase della procedura deve essere registrata sul registro di laboratorio, con il nome dell'operatore che l'ha effettuata, la data e ora, la eventuale strumentazione PCR utilizzata, il numero di lotto dei reagenti utilizzati e quanto si ritiene di utilità. Sullo stesso registro dovranno essere riportate le anomalie di laboratorio e il passaggio di consegne.

L'amplificazione viene eseguita sotto la cappa a flusso laminare (stanza 41). Il personale impegnato nella procedura deve verificare sull'apposito calendario la manutenzione della cappa.

Aspetti procedurali e logistici

La metodica pur essendo impegnativa per la tecnologia utilizzata e di alto costo, ha tempi di incubazione lunghi che non richiedono intervento dell'operatore; è importante che le attività svolte durante tali tempi sia svolte in prossimità della strumentazione in uso nella procedura di genotipizzazione.

Controlli di qualità interni


In ogni seduta di Genotipizzazione HPV devono essere inseriti controlli di qualità interna di seduta e precisamente:

- il bianco PCR (H_2O distillata sterile ultrapura o milliQ al posto del DNA);
- il controllo estrazione, cioè un campione clinico negativo per HPV estratto insieme ai campioni da analizzare (DNA da thin prep o da STM, nel caso nella seduta non siano presenti campioni in TP da estrarre).
- il DNA di un campione clinico anonimizzato e risultato positivo per lo stesso genotipo o genotipi in almeno due sedute diverse e del quale si dispone di sufficiente materiale per essere testato consecutivamente in almeno 10-15 sedute.
- su indicazione del Dirigente Responsabile potrà essere inserito anche il controllo positivo presente nel kit (generalmente non viene inserito in quanto la carica virale è molto alta e non rappresenta un buon controllo di seduta) o altri controlli aggiuntivi.

AMPLIFICAZIONE DEL DNA in PCR single step

Il Kit di amplificazione conservato a $-20^{\circ}C$ contiene:

- a) DNA plasmidico contenente parte del genoma di HPV61 (10^2 copie/ul)

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 3 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

b) 2 tubi HPV-Type Express MIX contenenti in totale 220ul di mastermix sufficienti per 20 test (nella master mix sono inclusi tutti i reagenti per l'amplificazione compresa la Taq e i primers per TST e per HPV).

La mastermix può essere scongelata per massimo due volte, non deve essere vortexata, ma miscelata per inversione e poi spinnata. Se si processano pochi campioni per volta, è opportuno fare piccole aliquote di mastermix.

Preparazione reagenti per reazione pcr:

- scongela il reagente HPV-Type Express MIX e, una volta scongelato, miscelare il reagente invertendo più volte la provette (non utilizzare il vortex) e centrifugarlo brevemente per eliminare gocce dal tappo.
- Allestire rapidamente la reazione a temperatura ambiente oppure lavorare in ghiaccio o su un blocco di raffreddamento.
- Per ciascun campione e controllo di seduta: preparare una provetta da 0,2 microlitri.
- Dispensare 20ul di master mix e aggiungere 5ul di DNA (Volume totale 25ul)
- Assicurarsi che non vi siano bolle nel fondo delle provette e centrifugarle a 4000 rpm per circa 1 minuto e trasferirle nel termociclatore.

Amplificazione:

- Trasferire le microprovette nel termociclatore Thermociclatore 9700GeneAmp, programma "HPV type express plus" (Durata 2 ore e 40 minuti circa).
- Al termine dell'amplificazione, se la tipizzazione viene eseguita in giornata, conservare le provette a 2/8°C se la tipizzazione viene eseguita in giornata, altrimenti conservare a -20°C fino al momento dell'utilizzo.


* L'amplificazione può essere condotta anche *overnight*.

Protocollo di amplificazione (Tabella 1)

Numero di cicli	Temperatura	Tempo
1 ciclo	50°C	2 min
	95°C	10 min
50 cicli	95°C	30 sec
	50°C	30 sec
	72°C	30 sec
1 ciclo	72°C	5 min
Storage	10°C	Infinito*

Controlli interni di seduta

Amplificare sempre, con i campioni da analizzare, il bianco PCR (alla mix va aggiunta H₂O al posto del DNA estratto) e il DNA di un campione clinico positivo per HPV con genotipo determinato. Secondo la procedura interna del laboratorio, amplificare il controllo estrazione: un campione HPV estratto nella serie in esame.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 4 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

TIPIZZAZIONE HPV CON AUTOBLOT 3000H

I campioni amplificati devono quindi essere sottoposti alla procedura di reverse line blot utilizzando le strip e i reagenti contenuti nel kit. Prima di eseguire il test, tenere i reagenti del kit a temperatura ambiente per una decina di minuti.

Strumento Autoblott 3000H

Lo strumento consente la pro cessazione di un massimo di 20 test per seduta (il vassoio è da 20 strip). Qualora il numero dei campioni da analizzare siano più di 20, è possibile eseguire due sedute consecutive, secondo quanto indicato nel paragrafo “Doppia seduta di tipizzazione”, sotto riportato.

Doppia seduta di tipizzazione: nel caso i campioni e i controlli siano più di 20, si procede con una unica PCR e due sedute di tipizzazione (eseguibili nella stessa giornata), procedendo nel seguente modo:

- inserire nella pcr un controllo positivo aggiuntivo, amplificando anche il K+ contenuto nel kit AB Analitica; quindi la nostra seduta di amplificazione conterrà 4 controlli: il K+ interno, il K+ del kit AB Analitica, il K- controllo di estrazione HPV neg, il controllo PCR negativo (H₂O)
- In ogni seduta di RLB deve essere inserito un controllo positivo e un controllo negativo quindi:
 - nel primo RLB analizzare il K+ interno e il controllo negativo PCR (H₂O)
 - nel secondo RLB analizzare il k+ kit e il controllo estrazione (HPV negativo; in questo caso funge anche da controllo negativo della tipizzazione).

Generalmente, la doppia seduta di tipizzazione viene effettuata quando i campioni sono più di 20 a settimana per due settimane consecutive.

Lo strumento Autoblott 3000H ha 6 pompe per la dispensazione dei reattivi, posizionate dietro lo strumento; ciascuna pompa è identificata in maniera univoca e presenta un'etichetta identificativa di diverso colore

Pompa 1: RIN

Pompa 2: STOP

Pompa 3: SUBST

Pompa 4: COND+


Pompa 5: COND non utilizzata per il programma HPV-1

Pompa 6: HYB

Lo stesso identificativo e colore si ritrova sul tubo corrispondente alla pompa e sui flaconi in cui andranno poste e miscelate le soluzioni.

Preparazione dello strumento

1. Accendere lo strumento (tasto dietro a destra); sullo schermo compare l'opzione “READY FOR A NEW TEST?” e premere YES.
2. Posizionarsi con le frecce sul programma desiderato (01-HPV) e premere ENTER.
3. Compare la scritta “PUMP PADS IN PLACE?”. Lo strumento chiede di chiudere le pompe sulle soluzioni localizzate sul retro dello strumento: tirare su le levette e bloccare il gancetto - prestare attenzione a non pinzare accidentalmente i tubi delle pompe adiacenti. Chiuse le pompe premere YES.
4. Collegare il tubo di scarico e avvitarlo bene.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing	Pag. 5 di 13
	Allegato 6	Ed. 3 Rev. 1
	Ampliquality HPV AB PCR e RLB	
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

5. Collocare la bottiglietta con la soluzione HYB1, contenente l'ancoretta magnetica, sull'alloggio apposito sulla piastra scaldante.

6. Comparare la scritta "PREHEAT SYSTEM?". Premere YES.

7. Comparare la scritta "CLOSE TRAY COVER". Premere ENTER.

L'Autoblot pre-riscalda la piattaforma del vassoio e la piastra sottostante le bottiglie per 30 minuti e inizia a oscillare. E' importante che il coperchio rimanga chiuso durante il pre-riscaldamento.

8) Preparare le soluzioni di lavoro (vedi tabella 2 Preparazione soluzioni). Ogni soluzione andrà calcolata considerando almeno un eccesso di circa 10ml per lo scarto dello strumento. Vedi tabella 3 "preparazione dei reagenti con autoblot 3000H". Per le soluzioni Hyb, Rin e Stop può essere riempito il flacone, senza necessità di calcolare la quantità precisa; per Cond+ e Subst preparare almeno la quantità necessaria per il numero di strip (riportata in tabella), approssimando alla quantità indicata dalla tacchetta superiore del tubo da 50ml. Non mescolare soluzioni di lotti diversi.

Riempire i flaconi con le soluzioni corrispondenti (controllare la rispettiva colorazione e dicitura) e collocarli nella rispettiva posizione nel rack dietro le pompe; riagitare le soluzioni prima di fare partire il test.

9. Terminato il preriscaldamento, lo strumento emetterà un allarme di avviso. Premere ALARM per spengerlo.


10. Comparare la scritta "PUT TUBES IN THE BOTTLES". Inserire i tubi corrispondenti in ciascuna soluzione (controllare la rispettiva colorazione). Premere ENTER.

11. Comparare la scritta "PRIME PUMPS". Premere YES. Lo strumento chiede di innescare le pompe, in modo da permettere il riempimento delle tubazioni delle pompe con il liquido. Seguire le istruzioni per avviare ciascuna pompa (prime pompe 1? ..., eccetto la 5, che non viene utilizzata). Controllare che esca il liquido senza bolle d'aria e che il tubo si muova, e premere il tasto YES più volte fino alla fluida dispensazione del liquido nel vassoio antigocciolamento. Questa fase può essere fatta a coperchio aperto. Dopo aver innescato la pompa, premere NO per passare alla pompa successiva da innescare. Alla fine chiede "Prime Pumps": premere NO per procedere.

12. Comparare la scritta "STRIP COUNT". Digitare il numero di strip sulla base dei campioni da tipizzare spostandosi con le frecce e premere ENTER.

8. Preparazione soluzioni (Tabella 2):

Soluzione	Nome su bottiglia	posizione	quantità per campione
HYB-1	HYB	Piastra riscaldante (aggiungere ancoretta)	2ml
CON-D1 + CON	COND+	Rack dietro le pompe	2ml di CON-D1 + 0.5 µl di CON agitare bene (spinnare prima di prelevare e attenzione al volume, è viscoso)
RIN	RIN	Rack dietro le pompe	4ml
STOP	STOP	Rack dietro le pompe	2ml
SUBSTRATO	SUBST	Rack dietro le pompe, in flacone rivestito di alluminio	2ml (Soluzione pronta all'uso)

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 6 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

No. Campioni	SUBSTRATE		COND		HYB-1 STOP Volume (mL) (*)	RIN Volume (*)
		Volume (mL)	CON (Streptavina coniugata) Volume (μL)	CON-D1 (Preriscaldata) Volume (mL)		
2		20	4	16	20	20
4		20	5	20	25	30
6		30	6	24	30	40
8		30	7	28	35	45
10		30	8	32	40	50
12		40	9	36	40	60
14		40	10	40	45	70
16		50	11	44	55	75
18		50	12	48	55	85
20		50	13	52	55	95

TABELLA 3 PREPARAZIONE DEI REAGENTI CON AUTOBLOT 3000H

13. Preparazione dei vassoi e delle strips

Numerare con la matita ciascuna striscia nella parte superiore la linea nera di posizione. Maneggiare le strisce sempre con i guanti.

Numerare con il lapis le strisce, identificandole da 1 a xx; numerare le strisce dei controlli con K+, KPcr, Kestr, K+kit. Fuori dallo strumento, caricare le strisce nel vassoio.


Numerare ciascuna vaschetta con il numero della striscia corrispondente. Il vassoio è da 20 test.

Le strisce 1-10 devono essere caricate a partire dal pozzetto immediatamente a destra del centro – **non** mettere strisce nel pozzetto centrale (c'è il sensore per il controllo della temperatura). Se le strisce sono più di 10, devono essere caricate a partire dalla immediata sinistra rispetto al pozzetto centrale. Caricare il primo campione nel pozzetto più a sinistra.

Nei pozzetti 10 e 20 caricare se possibile i controlli negativi, perché in questi pozzetti la temperatura è più elevata, non avendo un pozzetto accanto, e il substrato rimane più rosa (anche se poi con il lavaggio si schiarisce).

14) denaturazione degli amplificati (campioni e controlli)

- La denaturazione viene effettuata direttamente nelle vaschette dove sono posizionate le strip;

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 7 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

- dispensare nell'estremità in basso della vaschetta
20ul di DEN + 10ul amplificato corrispondente;
- miscelare bene per pipetta mento (almeno 6 volte);
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.

Effettuare questa operazione nell'estremità in basso della vaschetta, consente di evitare non schizzare poi i campioni contigui al momento della dispensazione della soluzione di ibridazione, che viene fatta nella parte in alto di ciascuna vaschetta.


15. Comparare la scritta "START ASSAY?". Premere YES.
 16. Comparare la scritta "PRESS ENTER LOAD TRAY": lo strumento chiede di caricare il vassoio con le strisce nella piastra preriscaldata. Si spengerà il riscaldamento mentre si carica il vassoio. Aprire il coperchio e mettere il vassoio sopra la piattaforma riscaldata. Il tempo in cui il riscaldamento rimane spento deve essere breve (5-10 secondi) in modo da essere sicuri che la temperatura della piattaforma non scenda. Premere ENTER.
 17. Riagitare le soluzioni prima di fare partire il test.
 18. Comparare la scritta "CLOSE TRAY COVER". Premere ENTER per far partire il test e riavviare il riscaldamento.
 19. Controllare la fase di dispensazione della soluzione di ibridazione. Lo strumento dispensa 1ml + 1ml, anche nel canale in più adiacente all'ultimo campione, in modo da avere le stesse condizioni di temperatura. Controllare che le strip non si girino. Se la coda della striscia rimane un po' sollevata, premere l'altra estremità con un puntale, in modo che la strip sia immersa bene nella soluzione. Questa fase può essere fatta a coperchio aperto.
- NB: Durante l'esecuzione automatica del protocollo, le diverse fasi del test vengono visualizzate sullo schermo dello strumento.

Il Programma 01 HPV ha una durata di circa 90 minuti

- Step 1: HYB 01HR 60 min 1 ciclo a 42°C
Step 2: COND+ 00HR 15 min 1 ciclo a 42°C
Step 3: RIN 00HR 2 min 2 cicli
Step 4: SUNST 00HR 5 min 1 ciclo allarme*
Step 5: STOP 00hr 2 min 1 ciclo

- **IMPORTANTE *** E' importante essere davanti allo strumento 10 minuti prima della fine della procedura, perché lo strumento va in allarme dopo i 5 minuti di colorazione ed è fondamentale essere davanti allo strumento, altrimenti si rischia che la colorazione prosegua e lo strumento non ci dice da quanto tempo è suonato l'allarme.
- Appare "CONTINUE INCUBATING? PRESS NO TO STOP": premere no quando riteniamo che la colorazione sia sufficiente (al massimo dopo altri 3 minuti).

Se alcuni campioni presentassero bande molto deboli, la colorazione può essere prolungata fino a un massimo di 10 minuti totali (si lasciano tutte le strip ancora a colorare, non è possibile lasciare solo quelle deboli). Il tempo di colorazione può variare in funzione della temperatura del locale e della carica virale del campione. Un tempo di colorazione prolungato può portare ad un aumento della colorazione di fondo e interferire con l'interpretazione dei risultati.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 8 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

20. Comparsa ASPIRATING. Viene aspirata la soluzione di stop.

21. Alla fine del test, lo strumento chiede di togliere il vassoio.

22. Comparsa "THERMACYCLER OPEN": premere ENTER.

Recupero soluzioni Autoblots:

Le soluzioni pronte avanzate possono essere rimesse nelle apposite bottigliette del kit. La soluzione di colorazione avanzata può essere congelata, tenendola al buio e riutilizzata per una sola volta.

MANUTENZIONE GIORNALIERA Autoblots 3000H

Sollevare i tubi dalle pompe togliendoli dai flaconi. Rimettere le soluzioni avanzate nelle rispettive bottigliette del kit.

Pulire accuratamente i flaconi delle soluzioni prima con acqua corrente e poi con acqua deionizzata.

Alla fine della seduta usare il programma PURGE TUBING per la pulizia dei tubi; premere YES.

Mettere tutti i tubi in una bottiglia/becker con soluzione etanolo 1:5 con acqua distillata tiepida (circa 200ml) e premere ENTER al messaggio "PLACE TUBES IN CLEANER".

I tubi rimangono nella soluzione di lavaggio per 5 minuti; poi suona l'allarme.

Apparirà il messaggio "PUT TUBES IN H2O": mettere i tubi in acqua deionizzata e premere ENTER.

Il sistema dispenserà acqua in tutti i tubi delle pompe e rimarrà nei tubi per 5 minuti.

Poi viene pompata altra acqua attraverso ogni tubo e comparirà il messaggio "REMOVE TUBES FROM H2O". Togliere i tubi dall'acqua e appoggiarli in un becker pulito. Premere ENTER e i tubi verranno svuotati.

Il sistema ora chiede "CLEAN DRIP TRAY": pulire delicatamente il vassoio antigocciolamento usando un panno senza pilucchi. Dopo averlo pulito premere ENTER.

Ora il sistema richiederà di sbloccare i cuscinetti a pressione sul retro dello strumento (RELEASE PRESSURE PAD) in modo che i tubi possano distendersi quando non sono in uso. Per sbloccare i cuscinetti a pressione, sollevare le levette di fianco a ciascuna pompa.

Premere ENTER per completare il programma di pulizia tubi.

Svuotare e risciacquare con H₂O il flacone di scarico.

Tipizzazione HPV con procedura manuale di back-up


Vedi manuale d'uso Ampliquality HPV type express (allegato 19)

Operazioni preliminari

- Prima dell'uso lasciare a temperatura ambiente il kit per alcuni minuti;
- Portare il bagnomaria alla temperatura di 42°C ed accertarsi che la mantenga per tutta la durata del procedimento con un margine di errore di $\pm 0,5^\circ\text{C}$;
- Preriscaldare nel bagnomaria o nel termoaggitatore la Soluzione HYB-1 e la Soluzione CON-D1;
- Numerare con una matita ciascuna striscia nella parte superiore la linea nera di posizione;
- Centrifugare brevemente le provette contenenti l'amplificato.

Denaturazione ed Ibridazione


- Miscelare l'amplificato e la soluzione di Denaturazione, come di seguito indicato:
Amplificato 10 μL

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 9 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Soluzione di Denaturazione 20 μ L

ATTENZIONE: la colorazione blu della soluzione DEN coadiuva la visibilità nell'aggiunta dell'amplificato, pertanto non altera il risultato.

- Incubare per 5 min a temperatura ambiente;
 - Nel frattempo estrarre con una pinzetta le strisce e numerarle con una matita al di sopra della linea di posizione. Maneggiare le strisce sempre con i guanti;
 - Immettere la vaschetta nel bagnomaria a livello dell'acqua prestando attenzione a non farla galleggiare (l'acqua del bagnomaria non deve assolutamente penetrare all'interno della vaschetta);
 - Posizionare con le pinzette le strip nella vaschetta ed aggiungere 1 mL di Soluzione HYB-1 preriscaldata in ogni canale utilizzato. Le strisce devono essere completamente immerse nella soluzione e con il lato su cui sono adese le sonde (identificabile dalla presenza di una linea nera) rivolto verso l'alto. Nel caso in cui la striscia si rivolti, riposizionarla con il giusto orientamento utilizzando le pinzette;
 - Aggiungere i 30 μ L di amplificato denaturato all'interno di ciascun canale (se si è effettuata la denaturazione in una provetta e non nel canale del vassoio);
 - Incubare 60 minuti a $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ agitando delicatamente (velocità d'agitazione ≤ 250 RPM). *Rilevazione colorimetrica;*
 - Poco prima del termine dell'incubazione preparare la diluizione della streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina nel seguente modo:
Per N campioni miscelare:
 - N x 0,5 μ L di Soluzione CON
 - N x 1 mL Soluzione CON-D1 (preriscaldata);
 - Aspirare completamente il liquido di ibridazione ed aggiungere 1 mL soluzione CON precedentemente diluita, porre nuovamente la vaschetta nel bagnomaria o nel termoagitatore a $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 15 minuti in agitazione;
 - Al termine dell'incubazione con il coniugato aspirare completamente il liquido ed aggiungere 1 mL di Soluzione RIN. Porre la vaschetta in agitazione a temperatura ambiente per 2 minuti;
 - Aspirare completamente il liquido e lavare nuovamente con 1 mL di Soluzione RIN per 2 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
 - Svuotare la vaschetta e aggiungere 2 mL di Soluzione di Colorazione **NBT/BCIP** pronta all'uso. Incubare per 5-10 minuti al buio in agitazione a temperatura ambiente.
- Il tempo di incubazione può variare in funzione delle condizioni ambientali (es. temperatura del locale) e della carica virale del campione. Un tempo di incubazione prolungato può portare ad un aumento della colorazione di fondo e interferire con l'interpretazione dei risultati;
- Svuotare la vaschetta e bloccare la reazione di colorazione lavando per 2 min con 1 mL di Soluzione STOP;
 - Aspirare il liquido e lavare per 2 min con acqua distillata;
 - Utilizzando le pinzette rimuovere le strisce dalla vaschetta e lasciarle asciugare fra due strati di carta assorbente. Questo passaggio garantisce l'eliminazione dell'eventuale colore di fondo, visibile sulla strip quando non ancora asciutta.
- Una volta asciutte le strip possono essere conservate al buio anche per parecchi anni.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 10 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Preparazione strips per la lettura allo scanner

Utilizzare le pinzette per rimuovere le strisce dalle vaschette e lasciarle asciugare tra due strati di carta assorbente. Questo passaggio garantisce l'eliminazione dell'eventuale colore di fondo, visibile sulla strip quando non è ancora asciutta.

Una volta asciutte le strip possono essere conservate al buio anche per diversi anni.

Attaccare le strip sul foglio di lettura delle strip allo scanner, coprendo tutta la strip con lo scotch.

Nel caso di impossibilità di stampare il foglio di lettura dal computer dello scanner, si attaccano le strip sul foglio "interpretation sheet" all'interno del kit e si procede all'interpretazione manuale mediante la maschera di interpretazione.

ACQUISIZIONE E INTERPRETAZIONE AUTOMATICA DI STRIP CON SISTEMA AB DIALUX (Ab analitica, cod. 08-RLB-02) (tra gli allegati il manuale d'uso)

Accendere il computer: utente, password "utente".

Aprire il programma AB Dialux sul desktop.

Effettuare il login: inserire nome utente e la password di accesso.

La voce sessione di lavoro indica la tipologia di kit che verrà utilizzata per la sessione che si sta iniziando.

I ruoli degli utenti sono:

- base: utente con autorizzazioni limitate alla sola visualizzazione;
- avanzato: utente con autorizzazioni per l'accesso a tutto il sistema, ad eccezione della accettazione modifica dei risultati diagnostici (referti);
- completo: utente con autorizzazioni complete nel sistema.

Si apre la schermata principale.

Nella zona a sinistra, contenente il menù principale del sistema, cliccare su "Gestione campioni".


Con il tasto "nuovo" si inseriscono i campioni e i controlli da analizzare. Per i controlli sempre presenti nella sessione (cioè K+ kit, bianco estrazione e bianco PCR) non è necessario creare ogni volta un nuovo campione ma, quando si associa il campione all'esame, può essere associato ogni volta lo stesso controllo per tipo. Nella schermata "Campione" inserire in "riferimento esterno" il numero identificativo del campione da analizzare. O **LEGGERE CODICE A BARRE CON LETTORE CODICE**.

Selezionare se "campione reale" oppure "controllo positivo" oppure "controllo negativo" (in questo modo, per i controlli il campione risulta idoneo anche se il TST è negativo).

Premere il tasto "salva".

Dopo che tutti i campioni da analizzare sono stati inseriti, dal menù a sinistra entrare in Gestione fogli di lavoro.

Si apre la schermata corrispondente. Il tasto "nuovo" a destra permette di creare un nuovo foglio di lavoro. Il sistema chiede il numero di esami da inserire nel foglio di lavoro; premere il tasto "crea". Per completare la creazione del foglio di lavoro, è necessario associare ad ogni esame del foglio un campione. Per farlo è sufficiente entrare nei dettagli dell'esame selezionato (tasto "dettagli" o doppio click sulla riga dell'esame). A questo punto l'esame può solamente essere associato ad un campione con il tasto "associa campione". Il tasto attiva la schermata di "gestione campioni", dove è possibile selezionare con doppio click uno per volta i campioni già inseriti che devono essere analizzati nella seduta.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 11 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Dopo la selezione, la schermata “esame” mostra il campione selezionato – se è tutto in ordine, l’esame deve essere salvato (tasto “salva”) e, con il tasto “indietro”, si ritorna alla schermata dei dettagli del foglio di lavoro. Si procede così per tutti i campioni da inserire nel foglio. L’esame appare “in lavorazione”.

Quando tutti gli esami del foglio di lavoro sono stati associati ad un campione, si può procedere con la stampa (tasto “stampa” a destra). La Stampa permette di ottenere un foglio con i dati identificativi del foglio di lavoro e le zone in cui fissare le strip per l’interpretazione.

La voce Scansione del foglio di lavoro permette di procedere alla scansione del foglio, una volta che le strip siano state processate e attaccate sul foglio di lavoro con il nastro adesivo invisibile. Si posiziona il foglio dentro lo scanner.

Si apre la schermata “scansione foglio di lavoro” e si preme il tasto “acquisisci” a destra; viene chiesto di selezionare lo scanner da utilizzare e quindi il sistema procede alla scansione del foglio. Il foglio scansionato viene mostrato nella zona centrale dello schermo; se l’immagine acquisita non presenta difetti evidenti (foglio storto, immagini parziali o con parti mancanti), si preme il tasto “analizza” per procedere alla fase di analisi.

Alla fine delle operazioni di analisi delle strip, si apre la schermata “foglio di lavoro”, con i risultati di ciascun esame.


Il tasto “seduta” attiva la stampa del report di seduta per il foglio di lavoro in esame. Il report di seduta è la stampa che riporta tutti i dati del foglio di lavoro, l’immagine della strip analizzata con evidenziate le bande considerate ed il risultato dell’interpretazione effettuata dal programma.

Il tasto “referto” permette di accedere alla schermata di gestione del risultato diagnostico dell’esame selezionato.

Nel caso in cui ci sono problemi nella stampa (per esempio esaurimento del toner che non permette di stampare) si procede in questo modo:

selezionare il foglio di lavoro di interesse e avviare la stampa; a questo punto si apre una finestra “seleziona stampante”, selezionare Microsoft XPS Document Writer e quindi stampa. Questo procedimento genera un File formato XPS che può essere trasferito su un altro computer per essere stampato tramite il programma XPS Viewer EP.

Il programma XPS Viewer EP può essere scaricato sul computer nel modo suggerito da ABANALITICA:

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 12 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Nel nostro sito abbiamo caricato 2 installer che potrebbero servire per la stampa provvisoria con altra stampante.

Per scaricare i file occorre:

- collegarsi all'indirizzo <http://www.abanalitica.it/doc>
- inserire
username: ispo
password: ispo21

I 2 installer presenti sono:

- PDF-Creator : Può essere installato direttamente sul computer AB Dialux, e permette di effettuare le stampe in .pdf. Non appena installato, ti ritroverai una stampante virtuale (simile alla XPS Printer) che permette di creare i file in .pdf che potranno poi essere copiati in un altro PC per essere stampati;

- XPS Viewer : Può essere installato in un altro computer per aprire i file .xps e quindi per stamparli.

Preferirei che inizialmente provassimo a installare l'XPS Viewer in un altro PC, quindi la 2° opzione.
Quando sei disponibile ti offro un supporto per l'installazione.

Nel frattempo ti chiederei di confermarmi prima possibile il vostro indirizzo (vedi e-mail precedente), in modo che possa spedirti il toner.

Ciao
Ronnye

==
Ing. Ronnye Pajaro
pajaro@abanalitica.it

Il TBLS che ha effettuato il RLB con autoblot 3000h:

- procede all'inserimento dei campioni nel software dello scanner e alla stampa del foglio di lavoro, attacca sul foglio di lavoro le strisce corrispondenti idoneamente identificate, effettua la lettura allo scanner e stampa il report di seduta
- Verifica che i risultati della lettura allo scanner dei controlli di qualità interni siano corrispondenti all'atteso:

a) Bianco PCR: campione inadeguato perchè nessuna banda è presente, oltre alla banda 'controllo di colorazione'

b) Controllo estrazione: HPV negativo, TST presente (presenza della banda gene umano di controllo e della banda controllo di colorazione)


c) Controllo positivo interno: HPV positivo per tipo HPV secondo l'atteso, come indicato sul quaderno di laboratorio 'HPV typing' (ultima pagina)

d) Controllo positivo del kit (se presente): HPV positivo per HPV 61 secondo indicazioni riportate nel kit in uso.

Nel caso di risultati anomali ne dà tempestiva comunicazione al Dirigente Responsabile del Lab HPV per le azioni da intraprendere.

- firma il foglio di lavoro relativo alla seduta analitica
- consegna le letture dello scanner, il foglio di lavoro contenente le strisce, il quaderno di laboratorio, la scheda fasi tipizzazione (all. 25) e le schede pazienti al Dirigente Responsabile del settore.

Il TBLS compila il report seduta analitica (allegato 27).

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV typing Allegato 6 Ampliquality HPV AB PCR e RLB	Pag. 13 di 13 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Allegati da consultare

Allegato 19 - MANUALE D'USO HPV-TYPE EXPRESS v.3.0

Sistema rapido di identificazione e tipizzazione del Papillomavirus Umano mediante PCR single step e reverse line blot.

Allegato 20 - MANUALE D'USO AB DIALUX AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS

Sistema per l'acquisizione e l'interpretazione automatica di strip.

Allegato 21 - GUIDA PER IL SOFTWARE AB DIALUX


Sistema per l'acquisizione e l'interpretazione automatica di strip.

- HPV-TYPE EXPRESS v.3.0 interpretation sheet.

- allegato 27: report di seduta analitica.

Strumentazione:

- cappa a flusso laminare
- termociclatore
- microcentrifuga
- autoblot
- bagno termostato
- computer
- scanner.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 7 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II PCR e RLB	Pag. 1 di 5 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

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

1. SCOPO

Esplicitare e rendere noto, a tutti gli operatori del Laboratorio Regionale Hpv e biologia molecolare di ISPO, coinvolti nella genotipizzazione del Papilloma virus umano, il protocollo di tipizzazione con il sistema INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II.

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 INNOLIPA di campioni cervico-vaginali afferenti ad ISPO.


3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

Protocollo genotipizzazione HPV con INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II (Fujierbio, cod. 81534).

3.1 Procedura preparazione dei campioni e master mix per PCR INNO-LiPA (frammento di 65bp)

Utilizzare il kit INNO-LiPA HPV genotyping Extra II AMP (key code FRI79764) conservato a -20°C. La master mix per l'amplificazione è pronta all'uso.

1. Utilizzare provetta da PCR da 0,2 ml.
2. Accendere uno dei seguenti termociclatori: PCR System 9700 thermal cyclers (Applied Biosystems), PCR System 2720 thermal cyclers (Applied Biosystems), i-cycler (Biorad); assicurarsi prima dell'uso che il thermal cycler sia calibrato.
3. Accendere la cappa biologica in stanza: preparazione molecolare 2 (n.41).
4. Prendere la master mix pronta all'uso (contiene i primers biotinilati SPF10 Plus, buffer, dNTP/dUTP mix, MgCl, AmpliTaq Gold e uracile-N-Glicosilasi) e il controllo di pcr (HPV 6 DNA e HLA-DPB1 DNA) dal frigo a -20°C e scongelarli a temperatura ambiente.
Dopo lo scongelamento, mescolare la master mix per inversione per 3 volte, vortexare il controllo positivo, e spinnare tutti i reagenti.
NB: Tenere questi reagenti fuori dal congelatore solo il tempo necessario per la preparazione della miscela di lavoro e rimettere in freezer immediatamente dopo l'uso.
5. Preparare la mix di pcr in ghiaccio, usando gli appositi portaprovette freddi ed evitare ritardi nel setup della reazione di pcr.
6. Determinare il numero di provette necessarie (N):
 numero dei campioni da testare
 + 1 controllo negativo PCR (noDNA) (K- acqua)
 + 1 controllo negativo di estrazione per ogni seduta di estrazione (K- estrazione) + 1 controllo positivo fornito dal Kit (K + Innolipa)

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 7 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II PCR e RLB	Pag. 2 di 5 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

- + 1 campione routine positivo (K + routine): l'inserimento di questo campione è opzionale.
- Usando puntali con filtro, per ciascun dispensare **40 µl di master mix** in ciascuna provetta di amplificazione DNA/DNase free.
 - Pipettare **10 µl di DNA**, spipettando almeno 3 volte, (i campioni prima e poi i controlli) in ciascun tubo corrispondente (nel controllo negativo aggiungere 10µl di acqua distillata).
 - Terminata la dispensazione dei campioni, disporre le provette appena preparate (contenenti mix+DNA) nel termociclatore e far partire la reazione di PCR.
 - Far partire il programma specifico per Innolipa HPV genotyping Extra II amplification.

3.2 PCR Cycling per INNO-LiPA

Selezionare sull'amplificatore il corretto profilo di temperature per INNO-LiPA (il nome del programma impostato su tutti i termociclatori sopramenzionati è INNO-LiPA):

Step	Temp	Time
1. Decontaminante	37°C	10 minuti (degradazione DNA contenente Uracile)
2. Denaturazione iniziale	94°C	9 minuti Inattivazione UNG e attivazione Amplitaq Gold
3. Denaturazione	94°C	30 sec
4. Annealing primers	52°C	45 sec Ripetere gli step da 3 a 5 per 40 volte
5. Estensione primers	72°C	45 sec
6. Hold 72°C	72°C	Durata inferiore alle 2 ore

Una volta terminati i cicli di amplificazione: stoccare immediatamente gli ampliconi a -20°C o processarli immediatamente in RLB, questo serve ad impedire la degradazione dell'amplicone generato, l'enzima UNG è inattivo a temperature superiori ai 55°C, di conseguenza non distrugge gli ampliconi generati durante la PCR.

3.3 Tipizzazione su RLB


Usare il kit INNO-LiPA HPV genotyping Extra II: key code FRI59684

Da conservare a +2-8°C; ogni Kit 20 strips

3.3.1 Procedura automatica su Autolipa 48: Vedi Manuale operativo AutoLiPA 48 allegato

Preparazione reagenti per procedura automatica:

Reagenti Innolipa	Diluizione	Volume da preparare
Hybridization solution	Pronto all'uso	(N x 2ml)+10 ml
Stringent Wash solution	Pronto all'uso	(N x 2ml)+20 ml
Rinse solution	1/5 in acqua distillata o deionizzata	(N x 12ml)+20 ml
Coniugato	1/100 in diluente del coniugato	(N x 2ml)+10 ml

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 7 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II PCR e RLB	Pag. 3 di 5 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Buffer substrato	Pronto all'uso	(N x 2ml)+10 ml
Substrato	1/100 in buffer del substrato	(N x 2ml)+10 ml

Esempio

Preparazione delle soluzioni

N° di strips	Rinse solution			Coniugato		Substrato	
	Rinse 5x	Acqua	Volume totale	Coniugato diluente	Coniugato 100x	Buffer substrato	Substrato 100x
	ml	ml	ml	ml	μl	ml	ml
5	14	56	70	20	200	20	200
10	26	104	130	30	300	30	300


Il numero di strip da utilizzare è uguale al numero dei campioni in analisi più i relativi controlli. In considerazione dell'elevato numero dei controlli inseriti in ogni procedura di typing e i derivanti costi aggiuntivi; il K + routine, se inserito e il k neg PCR (acqua), possono essere testati su una striscia tagliata a metà; per gli altri controlli è consigliabile usare strisce intere.

3.3.1 Procedura manuale di back-up

Ibridazione

- Accendere il bagnetto oscillante (CH2 + start) a 49°C esatti ($\pm 0,5$ °C) per evitare falsi positivi (temperatura troppo bassa) o falsi negativi/segnali deboli (temperatura troppo alta). Controllare la temperatura con un termometro calibrato.
 - o Precauzioni:
 - Chiudere sempre il coperchio del bagnetto durante l'incubazione, in modo da evitare segnali falsi positivi.
 - L'ampiezza del movimento è critica per ottenere la massima sensibilità e colorazione uniforme; l'ampiezza del movimento dovrebbe essere la più ampia possibile, evitando al contempo la fuoriuscita di liquido fuori dai pozzetti.
 - Controllare l'altezza dell'acqua, che deve essere tra 1/3 e 2/3 dell'altezza della piastra.
- Prendere il kit dal frigo, aspettare che arrivi a temperatura ambiente, poi mettere a riscaldare la Soluzione di Ibridazione e la Soluzione di Lavaggio Stringente ad una temperatura compresa tra i 37 e i 49°C. Miscelare prima dell'uso.
- Utilizzare un vassoio nuovo o prelevare dalla confezione il numero necessario di vaschette (1 per strip), numerarle e metterle nel vassoio.

Il numero di strip da utilizzare è uguale al numero dei campioni in analisi più i relativi controlli. In considerazione dell'elevato numero dei controlli inseriti in ogni procedura di typing e i derivanti costi aggiuntivi; il K + routine, se inserito e il k neg PCR (acqua), possono essere testati su una striscia tagliata a metà; per gli altri controlli è consigliabile usare strisce intere.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 7 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II PCR e RLB	Pag. 4 di 5 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015


- Pipettare 10 µl di Soluzione di Denaturazione (DS) nella parte in alto di ciascuna vaschetta utilizzando puntali con filtro. Chiudere immediatamente la boccetta dopo l'uso.
- Aggiungere 10µl di amplificato biotinilato alla soluzione di denaturazione e utilizzando puntali con filtro miscelare più volte, pipettando delicatamente.
- Incubare la miscela di denaturazione per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Agitare la Soluzione di Ibridazione preriscaldata, aggiungere 2 ml al denaturato nella vaschetta, utilizzando la pipetta da 1 ml (nella parte in fondo dove non c'è la miscela di denaturazione).
- Utilizzando le pinzette rimuovere il numero necessario di strips dalla provetta e identificarle, scrivendo il numero del campione con un lapis al di sopra della linea.
NB: toccare le strip solo sopra la linea e mai nella parte sottostante.
- Immediatamente porre in ogni vaschetta le strips che devono essere completamente immerse nella soluzione (se così non fosse aiutarsi con un puntale, cercando di disporle nel centro).
- Mettere la piastra nel bagnetto a 49°C, bloccandola da tutti i lati, chiudere il coperchio e incubare per 60 min in agitazione (circa 80rpm).

Lavaggi di stringenza

- Rimuovere la piastra dal bagnetto e, tenendola leggermente inclinata, aspirare il liquido utilizzando la pompa a vuoto (mettere all'estremità della punta un puntale senza filtro) e inclinando la vaschetta.
NB: quando si aspira con la pompa fare attenzione ad aspirare o sopra la linea delle strip o sotto fuori dalle strip.
- Aggiungere con una pasteur 2 ml di Soluzione di Lavaggio Stringente preriscaldata a 49°C e agitare delicatamente per 10 – 20 sec. a t.a.. Accertarsi che tutta la striscia sia ben lavata. Aspirare il liquido con la pompa a vuoto.
- Ripetere lo step di lavaggio, facendo attenzione a non lasciare asciugare le strips.
- Aspirare il liquido con la pompa a vuoto.
- Aggiungere, con la pipetta da 1 ml, 2 ml di Soluzione di Lavaggio Stringente preriscaldata, chiudere il coperchio e incubare per 30 min. in agitazione.
- Durante l'incubazione preparare in una beuta la Rinse Solution e il coniugato in una provetta falcon.

Sviluppo colorazione (passaggi tutti da effettuarsi a 20-25°C sul bagnetto oscillante, raffreddato)

- Aspirare con la pompa a vuoto la Soluzione di Lavaggio Stringente.
- Lavare per due volte le strips per 1 minuto con 2 ml (usando la pasteur) di rinse solution diluita e agitare a mano (inclinando delicatamente) per un minuto.
- Aspirare con la pompa a vuoto.
- Aggiungere 2 ml di soluzione coniugato e incubare in agitazione per 30 min..
- Durante l'incubazione preparare il substrato: preparare la soluzione substrato circa 10 minuti prima della fine della fase di incubazione del substrato in una falcon rivestita di carta stagnola e mantenerlo al buio fino all'uso.
- Aspirare con la pompa a vuoto.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 7 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II PCR e RLB	Pag. 5 di 5 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

- Lavare per due volte le strips, per 1 minuto, con 2 ml di rinse solution diluita e agitare a mano per un minuto.
- Aspirare con la pompa a vuoto.
- Lavare ancora usando 2 ml di Substrate Buffer.
- Aspirare con la pompa a vuoto.
- Aggiungere 2 ml di Soluzione substrato e incubare al buio (senza chiudere il coperchio del bagnetto, ma con il copripietra) per 30 min. in agitazione.
- Aspirare.
- Stappare lo sviluppo del colore lavando due volte le strip in acqua distillata, lasciando in agitazione per almeno 3 minuti.
- Aspirare con la pompa a vuoto.
- Utilizzando le pinze, rimuovere le strips e metterle sulla carta assorbente.
- Lasciare asciugare le strips completamente prima della valutazione.
- Allineare le strisce sul 'data reporting sheet', utilizzando la linea di controllo del coniugato.

Controlli interni

Ad ogni singola seduta di amplificazione e genotipizzazione vengono inseriti:

1. Un controllo positivo contenuto nel kit: K+ Innolipa
2. Un controllo negativo: Acqua RNase-free (K - Acqua)
3. Un controllo estrazione (HPV negativo): K- estrazione

E' opzionale l'aggiunta di campione routine positivo (K + routine).

Allegati

- Allegato 15: Innolipa Schede di sicurezza (MSDS INNO-LiPA)
- Allegato 16: Manuale AUTOLIPA instrument (Training Manual Auto-LiPA 48)
- Allegato 17: Manuale sistema LIRAS lettura strisce (SOP LiRAS for LiPA HPV EXTRA).

Strumentazione

Bagno termostatico oscillante (80rpm, con piano inclinato, temperatura a 49°C +/-0,5°C)

Termometri calibrati

Thermal Cycler

Frigorifero per conservare i reattivi e i campioni

Congelatore per la conservazione dei reattivi e dei campioni


Centrifuga

Vortex

Cappa aspirante

Strumentazione Auto-Lipa 48

Scanner e programma di lettura Innogenetics.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV genotyping Allegato 8 Ampliquality AB Validazione e refertazione risultati	Pag. 1 di 4 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

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

1. SCOPO

Definire la modalità di validazione e refertazione della ricerca del papillomavirus umano (HPV) con PCR.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione operativa deve essere applicata dal Biologo impegnato nella procedura di validazione e refertazione della Ricerca del Papilloma virus umano (HPV) con amplificazione genica.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

Protocollo validazione e refertazione HPV

Il Biologo verifica sui registri di laboratorio le anomalie di seduta, se presenti, segnalate dall'operatore (operatori) che ha effettuato la seduta analitica di PCR e RLB.

Il Biologo effettua la lettura manuale delle strisce, secondo le indicazioni del sistema utilizzato, verificando in primis i risultati dei controlli interni di seduta, verificando se gli esami possono essere validati e refertati.

1. La presenza della **banda di colorazione** conferma l'efficacia del legame del coniugato e della reazione del substrato.

2. La presenza della **banda del gene TST** indica l'utilizzo di un campione amplificabile: l'estrazione del DNA ha dato esito positivo.

Per i campioni che risultano non valutabili per mancanza della banda corrispondente all'amplificazione del gene umano di riferimento, nessuna banda HPV universale o banda HPV specifica, il Biologo valuta le azioni da intraprendere richiedendo la ripetizione dell'estrazione (se possibile) o la ripetizione di PCR e RLB su intero e/o diluito; in alternativa per tutti i tipi di prelievo è possibile effettuare anche una PCR home made per beta globina umana (vedi Allegato 11 PCR beta globina) e sulla base del risultato richiedere o meno la ripetizione del completa della procedura sullo stesso DNA intero o diluito o una nuova estrazione.


3. La comparsa della **banda della Sequenza Universale** documenta l'identificazione di un campione HPV positivo. Se si osserva la comparsa di questa banda e di quella di colorazione, ma non è presente alcun'altra banda, sono necessari metodi alternativi (sequenziamento) per identificare il genotipo presente.

In questi casi il Biologo valuta se ripetere il campione con altro sistema di genotipizzazione (Innolipa extra II o Linear Array HPV genotyping test Roche o sequenziamento nucleotidico).

4. La comparsa di una o più **bande** relative ai **genotipi** indagati consente l'identificazione dello specifico/i genotipo/i presenti nel campione analizzato.

SEGNALAZIONI:

· Si segnala che, a volte, le bande possono assumere parzialmente o completamente una colorazione tendente all'azzurro che non inficia l'interpretazione del risultato.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV genotyping Allegato 8 Ampliquality AB Validazione e refertazione risultati	Pag. 2 di 4 Ed. 3 Rev. 1 22/12/2015
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	

· Si segnala che, in presenza di una banda specifica, la banda della sequenza universale può essere **molto debole o assente**; questo può accadere inoltre:

- per campioni con bassa carica virale,
- per alcuni genotipi come HPV 39, 53, 61, 62, 64, 67, 71, 73, 81, 83, 90.

Indicazioni sulle azioni correttive suggerite in caso di risultati dei controlli interni non in linea con quelli attesi

La seduta di analisi può essere ripetuta solo dopo che siano state definite dal Dirigente Responsabile le azioni correttive e che tali azioni siano state adottate dal personale afferente alla S.S. Laboratorio HPV e oncologia molecolare, impegnato nella metodica di genotipizzazione. Altre azioni correttive specifiche possono essere ulteriormente indicate dal Dirigente Responsabile. Il Biologo segnala sul quaderno di Laboratorio genotipizzazioni le azioni da intraprendere e le modalità con cui ripetere i campioni.

Azioni suggerite:

1. Bianco PCR positivo per HPV e/o per gene umano di riferimento.

Azione correttiva: pulizia a fondo della cappa pre-PCR, con soluzione di ipoclorito di sodio al 0,5% e poi con etanolo 70%; autoclavare portaprovette e pipette della cappa pre-PCR; eliminare l'H₂O utilizzata per il bianco. Altre azioni correttive specifiche possono essere ulteriormente indicate dal Dirigente Responsabile.

Nuova seduta: ripetere PCR e tipizzazione dei campioni in analisi, utilizzando una nuova aliquota di H₂O per il bianco PCR.

2a. Controllo estrazione positivo per HPV

Azione correttiva: pulizia a fondo della cappa estrazione e della cappa pre-PCR, con soluzione di ipoclorito di sodio al 10% e poi con etanolo 70%; autoclavare portaprovette e pipette delle cappe estrazione e pre-PCR; eliminare le aliquote delle soluzioni utilizzare per l'estrazione del DNA. Altre azioni correttive specifiche possono essere ulteriormente indicate dal Dirigente Responsabile. Nuova seduta: ripetere l'estrazione dei campioni dubbi secondo le indicazioni date dal Dirigente Biologo, utilizzando nuove aliquote dei reagenti per l'estrazione; procedere con PCR e RLB: sul nuovo estratto.

2b. Controllo estrazione negativo per il gene umano di riferimento


Azione correttiva: eliminare le aliquote dei reagenti utilizzati per l'estrazione. Altre azioni correttive specifiche possono essere ulteriormente indicate dal Dirigente Responsabile.

Se i campioni da analizzare sono risultati tutti valutabili, in quanto positivi per TST o per HPV, la seduta di analisi può comunque essere considerata valida.

Nel caso di campioni negativi per TST, l'estrazione del DNA deve essere ripetuta; ripetere poi PCR e tipizzazione.

3a. Controllo interno positivo per tipi HPV diversi dall'atteso

Azione correttiva: pulizia a fondo della cappa pre-PCR, con soluzione di ipoclorito di sodio al 10% e poi con etanolo 70%; autoclavare portaprovette e pipette della cappa pre-PCR; eliminare l'aliquota del DNA di questo controllo positivo. Altre azioni correttive specifiche possono essere ulteriormente indicate dal Dirigente Responsabile.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV genotyping Allegato 8 Ampliquality AB Validazione e refertazione risultati	Pag. 3 di 4 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Nuova seduta: ripetere PCR e tipizzazione, utilizzando una nuova aliquota del DNA del controllo positivo; inserire anche il controllo positivo del kit.

3b. Controllo interno positivo negativo per HPV

Nuova seduta: ripetere PCR e tipizzazione, utilizzando una nuova aliquota del DNA del controllo Positivo e sulla stessa aliquota risultata negativa; inserire anche il controllo positivo del kit.

Azione correttiva: identificata dal Dirigente sulla base del risultato della nuova seduta; se l'aliquota ripetuta si conferma negativa e la nuova aliquota positiva per il risultato atteso, eliminare l'aliquota del DNA di questo controllo positivo. Se il campione si conferma negativo su entrambe le aliquote, ripetere la seduta con un nuovo controllo. Le azioni successive saranno indicate dal Biologo.

Azioni correttive e di verifica suggerite per sedute con anomalie generali

Il Biologo darà indicazioni su come procedere, segnalando sul registro di laboratorio. Di seguito vengono elencate alcune problematiche che potrebbero verificarsi in una seduta di genotipizzazione e suggerite alcune azioni correttive e/o di verifica su cui effettuare i controlli.

a) *Nel caso di sedute o strisce in cui nessuna banda è presente*, oltre a quella relativa al controllo di colorazione, possono essersi verificati dei problemi durante l'ibridazione:

- Verificare la presenza dell'amplificato mediante elettroforesi in gel di agarosio al 3%
 - Se presenti, ripetere la seduta di Reverse Line Blot, seguendo scrupolosamente le istruzioni riportate al paragrafo 11.3 del libretto istruzioni del kit
 - Se assenti, possono essersi verificati dei problemi durante l'amplificazione:
 - Se l'amplificato non è stato utilizzato subito o conservato a -20°C, l'enzima UNG potrebbe essersi riattivato ed aver eliminato il prodotto di PCR
 - utilizzare una pipetta ed un puntale di volume adeguati per aggiungere la quantità di DNA indicata in metodica
 - controllare il programma selezionato nel termociclatore: deve corrispondere a quello indicato nel manuale d'uso, quindi ripetere l'amplificazione con il programma corretto
 - conservare la mastermix di amplificazione e il controllo positivo a -30°/-20°C, evitando ripetuti congelamenti e scongelamenti del Box F
 - possono essersi verificati dei problemi durante l'estrazione, che hanno determinato assenza o presenza di poco DNA nell'eluato.

b) *Bande deboli o assenti (compresa quella del Controllo di Colorazione)*

- Quantità nulla o insufficiente di coniugato o di substrato utilizzato.


c) *Colorazione non omogenea*

- Le strisce non sono state completamente sommerse durante le fasi di incubazione
- Le vaschette non sono state sufficientemente agitate.

d) *Risultati inattesi*

- verificare la temperatura di incubazione, potrebbe essere non corretta
- Soluzione HYB-1 e/o Soluzioni CON-D1 non adeguatamente preriscaldate o miscelate.


- tutti/molti campioni positivi rispetto all'atteso:

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	Codice Aziendale CP005
	HPV genotyping Allegato 8 Ampliquality AB Validazione e refertazione risultati	Pag. 4 di 4 Ed. 3 Rev. 1 22/12/2015
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	

- Contaminazione del DNA isolato e/o dei reattivi di amplificazione con DNA isolato e/o amplificato
- Contaminazione dei canali adiacenti in seguito a schizzi durante i primi passaggi di lavaggio.
- molte bande positive su un campione: possibile presenza di una altissima carica virale, si può avere un rapido ed intenso sviluppo di una banda, a cui poi molte altre bande diventano positive per reazioni di cross ibridazione, dovuta all'alta carica virale; ripetere il test e interrompere tempestivamente l'incubazione del substrato, appena la banda diventa chiaramente visibile, per prevenire lo sviluppo di bande dovute a reazioni di crossibridazione.

Refertazioni dei risultati dei campioni analizzati:

- Per ciascun campione confronta il risultato della lettura manuale con la scansione automatica effettuata con lo scanner e dal software collegato. Nel caso di discordanza tra le due letture, solo nel caso in cui la discordanza è attribuibile alle cross-reattività dichiarate dal produttore per HPV18-HPV45, HPV26-HPV44, HPV51-HPV82, HPV 62-HPV81, il Biologo considera valido il genotipo primario, così come segnalato dal software di interpretazione delle strip. Nel caso di strisce di dubbia interpretazione, consulta il Dirigente Responsabile di settore. Se uno o più campioni devono essere ripetuti, li segnala nel registro di laboratorio e lascia le schede nel registro stesso.
- Il Biologo riporta il risultato HPV finale sul report di seduta, accanto all'interpretazione dei risultati eseguita dallo scanner e appone la propria firma.
- Il risultato finale viene anche trascritto sulla scheda paziente e sul registro "Scheda fasi tipizzazioni" (Allegato 25), dopo avere verificato la corrispondenza tra identificativo di laboratorio, i dati anagrafici e gli identificativi riportati sul registro (doppio controllo: risultato da scheda strip a registro; risultato da scheda strip a scheda paziente; verifica corrispondenza risultato e dati anagrafici tra scheda paziente e registro).
- Il Biologo procede all'inserimento delle risposte in Nute, secondo i passaggi riportati a paragrafo 5.7 "Inserimento risultati nel gestionale di laboratorio".
- Il personale amministrativo del laboratorio procede alla stampa dei referti, secondo quanto riportato nel paragrafo 5.2 "Stampa e firma Risposte esami: solo per test con richiesta medica".
- Il Dirigente, prima di firmare, effettua un controllo tra scheda e registro, verifica i dati trascritti.
- Il personale di segreteria o back office provvede all'invio delle risposte secondo le procedure usuali di ISPO.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 9 INNO-LiPA extra II - Refertazione	Pag. 1 di 4 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

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

1. SCOPO

Esplicitare e rendere noto, a tutti gli operatori del Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare di ISPO, coinvolti nella refertazione dei risultati della genotipizzazione HPV con INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II da campioni di cellule cervicali prelevate in STM, il protocollo per la refertazione della ricerca tipizzazione HPV (INNO-LiPA).


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, coinvolti nella refertazione dei risultati della genotipizzazione HPV con INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II afferenti ad ISPO.


3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

Protocollo Refertazione HPV Ricerca e Tipizzazione (INNO-LiPA)

- Al termine della tipizzazione con INNO-LiPA, si attaccano le strisce sviluppate ed idoneamente identificate sull'apposito modulo di lettura del sistema INNO-LiPA, fornito con il Kit e si riporta per esteso l'identificativo corrispondente a ciascuna striscia. Ciascun modulo di lettura verrà poi inserito nel registro di laboratorio, in cui vengono riportati il n. identificativo campione, data estrazione, operatore che esegue l'estrazione, n. lotto kit di estrazione, data pcr, lotto kit pcr, data scadenza kit pcr, operatore pcr, macchina pcr utilizzata, data reverse line blot, operatore reverse line blot, lotto kit e data scadenza. Effettuare la lettura delle strisce quando sono completamente asciutte con l'ausilio del programma specifico INNO-LiPA, secondo il protocollo riportato nel kit e stampare le letture generate automaticamente dallo scanner.
- **Interpretazione dei risultati**
 - a. L'Interpretazione dei risultati viene effettuata con il software Liras for Lipa HPV versione 3.00, disegnato per assistere nell'interpretazione automatica dei risultati delle strips (Allegato 4).
I genotipi rilevati sono 32.
Ad ogni singola banda corrisponde un genotipo (nella versione II non c'è più l'interpretazione di più pattern di bande)
 - b. Dopo la lettura automatica, il laureato responsabile procede ad una verifica del risultato prodotto, secondo le modalità di interpretazione riportata nel manuale del kit. Le linee presenti in ciascuna striscia devono essere interpretate, comparandole alla INNO-LiPA HPV genotyping *Extra* II card di interpretazione fornita con il kit.
 - c. Per validare la seduta occorre verificare che:
 - i. il K estrazione: abbia sempre la banda di controllo interno e quella del coniugato
 - ii. il K neg acqua: abbia sempre solo la banda del coniugato
 - iii. il k+ Innolipa: abbia sempre la banda del controllo interno, la banda corrispondente ad HPV 6 e la banda del coniugato.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 9 INNO-LiPA extra II - Refertazione	Pag. 2 di 4 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

- d. Il risultato del K+ routine (se inserito) deve corrispondere al tipo di HPV atteso; eventuali discordanze devono tenere conto se il campione era stato testato inizialmente con lo stesso metodo o con metodo differente. Il laureato valuterà, in base alla propria esperienza, le eventuali difformità dal risultato atteso e le eventuali azioni da intraprendere. I risultati di questo K+ routine non rientrano, di norma, nella validazione della seduta, fatto salvo un suo risultato completamente negativo o la presenza di contaminazione.
- e. In caso di discordanza tra lettura automatica Liras e lettura manuale, si procede alla rilettura manuale da parte di un altro laureato.
- f. I due lettori verificano poi i loro risultati di lettura e:
 - i. Se concordanti, la lettura manuale viene riportata sul foglio scannerizzato e su questa si basa la procedura di validazione del risultato del campione o del controllo
 - ii. In caso di discordanza tra le due letture manuali, i due lettori rileggono insieme la striscia e arrivano alla definizione condivisa della lettura del campione. Sul risultato di questa lettura combinata si basa la procedura di validazione del risultato del typing. Entrambi i lettori siglano il risultato sul foglio Liras.
- g. Nel caso in cui la lettura manuale del primo operatore sia discordante da quello dello scanner per il K+ routine (o K neg acqua o altro) su striscia tagliata, anche in questo caso deve essere effettuata la doppia lettura da parte di due operatori.
- h. I campioni che non hanno nessuna linea tipo-specifica (linee 1-32), ma hanno almeno una linea positiva per il controllo HPV, vengono interpretati come HPV positivi, ma non tipizzabili (HPV X).
- i. I campioni non valutabili per assenza di banda di controllo interno (HLA-DPB1) e assenza HPV vengono ritestati e nel caso di conferma del risultato non valutabile, si procederà all'estrazione della seconda aliquota stoccata:
 - i. Nei casi in cui la lettura automatica delle strisce con lo scanner, evidenzia in un campione solo la banda del coniugato, ma nessuna banda sia per HLA-DPB1 che per HPV (no linee HPV 1, né HPV2, né bande specifiche), il campione deve essere testato con una pcr con primer per beta globina (vedi istruzione operativa pcr beta globina Allegato 11)
 - ii. Se pcr beta globina home made negativa, ripetere estrazione
 - iii. Se pcr beta globina positiva: ripetere intera procedura INNO-LiPA sullo stesso amplificato e su campione diluito (vedi tabella) per escludere eventuali inibitori
 1. se persistente non amplificabilità con INNO-LiPA, fare una PCR con primer GP5+/GP6+ (vedi istruzione operativa pcr primer Gp5+/Gp6+ Allegato 13) per valutare la positività o negatività del campione all'HPV; se positivo, sequenziare l'amplificato ottenuto (vedi istruzione operativa sequenziamento DNA di HPV allegato 14).
- j. Se la positività a GP5+/6+ fosse dovuta alla presenza di più di un tipo di HPV la sequenza risulterà non leggibile. In questo caso il campione sarà identificato come HPV positivo, tipo specifico non ulteriormente tipizzabile.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 9 INNO-LiPA extra II - Refertazione	Pag. 3 di 4 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

- k. Un campione con tutte le linee positive non può essere interpretato; ripetere in questi casi l'intera procedura, eventualmente anche estrazione.


Sintesi:

HPV risultato	hDNA risultato	Interpretazione
-	-	Risultato invalido: la mancata positività al controllo hDNA indica un'inadeguata raccolta del campione, inadeguato processamento o presenza di inibitori nel DNA estratto. In quest'ultimo caso ripetere il campione diluito 1:10. Se il problema permane, riprocessare il campione dall'inizio partendo da una nuova aliquota
-	+	HPV NEGATIVO: un risultato negativo sia per le linee di controllo HPV che per le linee da HPV tipo-specifiche indica l'assenza di HPV DNA, ma non può escludere la presenza di una infezione da HPV
+	+ o -	HPV positivo: Un risultato positivo per almeno una delle linee HPV tipo specifiche indica la presenza di DNA di HPV. La presenza di addizionali tipi di HPV può non essere completamente esclusa.* Se è presente nel campione un'alta quantità di HPV, è possibile che la banda del controllo DNA umano sia negativa a causa della competizione tra DNA umano e virale
≥ 7 su 12 bande positive consecutive	+ o -	Un segnale positivo di almeno 7 su 12 bande consecutive sulla strip deve essere interpretato come possibile risultato invalido. E' consigliato di ripetere l'intera procedura a partire dall'estrazione del DNA. Se il risultato si ripete una seconda volta, potrebbe essere dovuto a un risultato vero per certe popolazioni, tipo soggetti immunosoppressi, con infezioni multiple

➤ **Risultato finale genotyping (Innolipa+pcr singole di conferma/esclusione)**

Dopo aver concluso tutte le analisi aggiuntive per ciascun campione, l'operatore che ha effettuato i test procede alla verifica dei risultati insieme al Biologo come sotto riportato:

- controlla l'esatta corrispondenza tra n. sulla striscia e identificativo paziente (verificando sul foglio di lavoro)
- ricontrolla le letture delle strisce INNO-LiPA effettuate con il computer, effettuando al contempo una lettura manuale come controllo di qualità
- interpreta il gel dei primer singoli effettuati e/o della beta globina e/o di GP5+/6+
- trascrive il risultato finale (combinato Innolipa + PCR singole) sulla scheda del LIRAS e firma i risultati

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 9 INNO-LiPA extra II - Refertazione	Pag. 4 di 4 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015


- i risultati vengono quindi inseriti nel registro HPV interno lab ricerca (allegato 26) e successivamente vengono inseriti manualmente nel database.

Strumentazione:

Scanner e programma di lettura Innogenetics.

Istruttoria per Risultato inaccettabile di Valutazione Esterna di Qualità o EQA-External Quality Assessment HPV typing

Data dell'indagine	
Identificativo del campione VEQ	
Data dell'analisi	
Risultato inaccettabile	
Risultato atteso	
Intervallo di accettabilità	
Indagine sulla FASE ANALITICA	
Conclusioni	
Classificazione del problema	<input type="checkbox"/> errore di trascrizione <input type="checkbox"/> metodologico <input type="checkbox"/> tecnico <input type="checkbox"/> del materiale VEQ <input type="checkbox"/> di valutazione della VEQ <input type="checkbox"/> inspiegabile <input type="checkbox"/> altro(specificare).....
Azioni correttive	
Approvazioni	Data Firma

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING Allegato 11 PCR beta - globina	Pag. 1 di 3 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

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

1. SCOPO

Esplicitare e rendere note, a tutti gli operatori del Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare di ISPO, coinvolti nella esecuzione della genotipizzazione HPV da campioni di cellule cervicali prelevate in STM il protocollo per l'esecuzione della PCR per beta-globina.

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, coinvolti nella genotipizzazione HPV afferenti ad ISPO.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

L'analisi viene eseguita sul Dna estratto secondo le IO estrazione e utilizzato per la genotipizzazione tipo specifica con Innolipa.

Vengono utilizzati i primers di Bauer et al (1):

Primer PC04 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CCC – 3'

Primer GH20 5'- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC – 3'


che producono un frammento di 268bp.

- 1) scongelare i campioni estratti
- 2) Preparare la Master mix:

Reagenti	Stock conc.	Conc.di lavoro	Conc/PC R	Volume /PCR
Volume DNA				5 µl
GeneAmp 10X PCR Buffer (con MgCl ₂)	10X	10X	1X	2.5 µl
dNTPs	100mM	2.5mM	0.2mM	2 µl
Primer GH20	100 □ M	10 □ M	0.5 □ M	1.25 µl
Primer PC04	100 □ M	10 □ M	0.5 □ M	1.25 µl
AmpliTaq Gold	5U/µl	5U/µl	2.5 U	0.5 µl
Acqua RNase-free				12.5 µl
Tot mix di reazione				25 µl

Oppure:

Reagenti	Stock conc.	Conc.di lavoro	Conc/PC R	Volume /PCR
Volume DNA				5 µl
GeneAmp 10X PCR Buffer II	10X	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂	25mM	25mM	1.5mM	1,5 µl

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING Allegato 11 PCR beta - globina	Pag. 2 di 3 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

dNTPs	100mM	2.5mM	0.2mM	2 µl
Primer GH20	100 □ M	10 □ M	0.5 □ M	1.25 µl
Primer PC04	100 □ M	10 □ M	0.5 □ M	1.25 µl
AmpliTaQ Gold	5U/µl	5U/µl	2.5 U	0.5 µl
Acqua RNase-free				11.0 µl
Tot mix di reazione				25 µl

3) Numerare i tubi di PCR da 0,2 secondo lo schema di lavoro e dispensare in ciascuna provetta 20 □ l di master mix

4) Aggiungere 5 µl di campioni nei tubi contenenti 20 µl di master mix

5) Controlli:

In ciascuna PCR è necessario inserire sempre un controllo positivo (campioni positivo al DNA umano) e un controllo negativo (Acqua RNase-free). I controlli sono aggiunti con le stesse modalità usate per i campioni

6) Mettere i tubi di PCR nella macchina di PCR e far partire il saggio usando il seguente protocollo di amplificazione:

94°C per 12 minuti

35 cicli: 94°C 30 secondi

56°C 30 secondi

72°C 30 secondi

72°C 11 minuti

Questo tipo di PCR può essere eseguito nel termociclatore i-cycler (Biorad), my-cycler (Biorad), 9700 Applied Biosystems; 2720 Applied Biosystem: il nome del programma è betaglobina home made, assicurarsi prima dell'uso che il thermal cycler sia calibrato(vedi istruzioni calibrazione allegate).

7) Valutazione ed interpretazione dei risultati

Gli amplificati devono essere corsi su gel d'agarosio al 2% TAE.

La lunghezza dell'amplificato è 268bp.


Il saggio viene validato se il controllo positivo per beta globina è positivo e il controllo negativo (Acqua RNase-free) non presenta bande.

Norme di sicurezza

Vengono seguite tutte le indicazioni riportate nell'allegato 10: Istruzione Operativa Buona Pratica.

Reagenti

Reagente	Conservazione	Produttore/codice
dNTP	Freezer -20C	ROCHE / Cat No.03 622 614 001
GeneAmp 10X PCR Buffer	Freezer -20C	Applied Biosystem / N808-0240
GeneAmp 10X PCR Buffer II	Freezer -20C	Applied Biosystem / N808-0241
AmpliTaQ Gold	Freezer -20C	Applied Biosystem / R09833
MgCl ₂	Freezer -20C	Applied Biosystem / R13271
Acqua RNase-free	Freezer -20C	Qiagen / 1012888
Primers Gh20/PC04	Freezer -20C	Laboratories EURO BIO
TAE	Camera Oscura	


 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING Allegato 11 PCR beta - globina	Pag. 3 di 3 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Strumentazione

Thermal Cycler
 Cappa aspirante
 Transilluminatore
 Apparato fotografico
 Vasca elettroforetica

Bibliografia

1. Bauer, H. M., Ting, Y., Greer, C., Chambers, J., Tashiro, C., Chimera, J., Reingold, A. & Manos, M. M. (1991). Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 265, 472±478.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 12 PCR HPV Tipo Specifica	Pag. 1 di 3 Ed.3 Rev.1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

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

1. SCOPO

Lo scopo del presente documento è di esplicitare e rendere note, a tutti gli operatori del Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare di ISPO, coinvolti nella esecuzione della genotipizzazione HPV da campioni di cellule cervicali prelevate in STM il protocollo per l'esecuzione della PCR tipo specifica.

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 coinvolti nella genotipizzazione HPV afferenti ad ISPO.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

3.1 Primers PCR HPV tipo specifiche:

Per escludere o confermare i tipi HPV specifici si utilizzano i primers riportati nell'articolo Walboomers,1999 (1) o primer disengati da noi.

HPV52 forward: GCAGAACAAGCCACAAGCAA

HPV52 reverse: TAGAGTACGAAGGTCCGTCG

Lunghezza amplificato per HPV52:104bp

HPV56 forward:GGTGCAGTTGGACATTCAGAG

HPV56 reverse:GTTACTTGATGCGCAGAGTG

Lunghezza amplificato per HPV56: 106bp.

HPV39 forward CCAGACGGGATGAACCACAG

HPV39 reverse TAGGATTTGTGTGTCCGTGGTG

Lunghezza amplificato: 151bp

HPV68a forward: CAGACTCTACTGTACCAGCTGTGTATGA

HPV68a reverse: GCACCTGTTAAAAAAGATCCCTATG

Lunghezza amplificato: 285bp

HPV68b forward: TCTACTACTACTGAATCAGCTGTACCAAATATT

HPV68b reverse: CCTGCACCTACTAAAAAGGATCCA


Lunghezza amplificato: 291bp

HPV42 forward: ACGTGTGAGACACCCATTGA

HPV42 reverse:ATCCGCCATTGCAGTTACTC

Lunghezza amplificato: 244bp

La mix di PCR è la stessa per tutte le coppie di primers.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 12 PCR HPV Tipo Specifica	Pag. 2 di. 3 Ed.3 Rev.1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

- 1) scongelare i campioni estratti
- 2) Preparare la Master mix:

Reagenti	Stock conc.	Conc lavoro	di	Conc/PCR	Volume /PCR
Volume DNA					5 µl
GeneAmp 10X PCR Buffer II	10X	10X		1X	2.5 µl
MgCl ₂	25mM	25mM		1,5mM	1,5 µl
dNTPs	100mM	2.5mM		0.2mM	2 µl
Primer tipo specifico	100 □ M	10 □ M		0.5 □ M	1.25 µl
Primer tipo specifico	100 □ M	10 □ M		0.5 □ M	1.25 µl
AmpliTaq Gold	5U/µl	5U/µl		1.25 U	0,25 µl
Acqua RNase-free					11.25 µl
Tot mix di reazione					25 µl

3) Numerare i tubi di PCR da 0,2 secondo lo schema di lavoro e dispensare in ciascuna provetta 20 □ l di master mix

4) Aggiungere 5 µl di ciascun campione nei tubi contenenti 20 µl di master mix

5) Controlli :

In ciascuna PCR è necessario inserire sempre un controllo positivo (campione HPV tipo specifico positivo) e un controllo negativo (Acqua RNase-free). I controlli sono aggiunti con le stesse modalità usate per i campioni

6) Mettere i tubi di PCR nella macchina di PCR e far partire il saggio usando il seguente protocollo di amplificazione:

94°C per 9 minuti

40 cicli: 95°C 30 secondi

55°C 30 secondi

72°C 30 secondi

72°C 5 minuti

Questo tipo di PCR può essere eseguito nei termociclatori:


- ✓ PCR System 9700 thermal cyclers (Applied Biosystems),
- ✓ PCR System 2720 thermal cyclers (Applied Biosystems),
- ✓ i-cycler (Biorad); my-cycler (Biorad),

il nome del programma è HPV singoli GOLD, assicurarsi prima dell'uso che il thermal cycler sia calibrato(vedi istruzioni calibrazione allegata).

7) Valutazione ed interpretazione dei risultati

Gli amplificati devono essere corsi su gel d'agarosio al 2% TAE valutando la lunghezza dell'amplificato del tipo specifico HPV.

Il saggio viene validato se il controllo HPV tipo specifico positivo è positivo e il controllo negativo (Acqua RNase-free) non presenta bande.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 12 PCR HPV Tipo Specifica	Pag. 3 di. 3 Ed.3 Rev.1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Norme di sicurezza


Vengono seguite tutte le indicazioni riportate nell'allegato 10: Istruzione Operativa Buona Pratica

Reagenti

Reagente	Conservazione	Produttore/codice
dNTP	Freezer -20C	ROCHE / Cat No.03 622 614 001
GeneAmp 10X PCR Buffer II	Freezer -20C	Applied Biosystem / N808-0241
AmpliTaq Gold	Freezer -20C	Applied Biosystem / R09833
MgCl ₂	Freezer -20C	Applied Biosystem / R13271
Acqua RNase-free	Freezer -20C	Qiagen / 1012888
Primers HPV 42, HPV 52, HPV 56	Freezer -20C	TIP MOLBIO
Primers HPV 39, HPV 68	Freezer -20C	EUROFINS

BIBLIOGRAFIA

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 13 PCR GP5+/GP6+	Pag. 1 di 3 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

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

1. SCOPO

Lo scopo del presente documento è di esplicitare e rendere note, a tutti gli operatori del Laboratorio Regionale HPV e biologia molecolare di ISPO, coinvolti nella esecuzione della genotipizzazione HPV da campioni di cellule cervicali prelevate in STM il protocollo per l'esecuzione della PCR GP5+/GP6+.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione si applica nell'ambito delle attività del personale del Laboratorio HPV del Presidio di Villa delle Rose di ISPO, coinvolti nella genotipizzazione HPV afferenti ad ISPO.

3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'

Protocollo PCR GP5+ / GP6+

Vengono utilizzati i primers di Walboomers et al (1):

Primer GP5+ 5'- TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC – 3'


Primer GP6+ 5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT – 3'

che producono un frammento di 150bp

- 1) scongelare i campioni estratti
- 2) Preparare la Master mix:

Reagenti	Stock conc.	Conc lavoro	di	Conc/PCR	Volume /PCR
Volume DNA					5 µl
GeneAmp 10X PCR Buffer II	10X	10X		1X	2.5 µl
MgCl ₂	25mM	25mM		3,5mM	3,5 µl
dNTPs	100mM	2.5mM		0.2mM	2 µl
Primer Gp5+	100 □ M	10 □ M		0.5 □ M	1.25 µl
Primer Gp6+	100 □ M	10 □ M		0.5 □ M	1.25 µl
AmpliTaq Gold	5U/µl	5U/µl		2.5 U	0,5 µl
Acqua RNase-free					9 µl
Tot mix di reazione					25 µl

- 3) Numerare i tubi di PCR da 0,2 secondo lo schema di lavoro e dispensare in ciascuna provetta 20 □ l di master mix
- 4) Aggiungere 5 µl di ciascun campione nei tubi contenenti 20 µl di master mix
- 5) Controlli:

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 13 PCR GP5+/GP6+	Pag. 2 di 3 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

In ciascuna PCR è necessario inserire sempre un controllo positivo (campione HPV positivo) e un controllo negativo (Acqua RNase-free). I controlli sono aggiunti con le stesse modalità usate per i campioni

- 6) Mettere i tubi di PCR nella macchina di PCR e far partire il saggio usando il seguente protocollo di amplificazione:

Protocollo di amplificazione:

94°C per 9 minuti

40 cicli: 95°C 20 secondi

38°C 30 secondi

71°C 80 secondi

71°C 4 minuti

10°C infinito

Questo tipo di PCR può essere eseguito nei termociclatori:

- ✓ PCR System 9700 thermal cyclers (Applied Biosystems),
- ✓ PCR System 2720 thermal cyclers (Applied Biosystems),
- ✓ i-cycler (Biorad); my-cycler (Biorad),

assicurarsi prima dell'uso che il thermal cycler sia calibrato (vedi istruzioni calibrazione allegate).

- 7) Valutazione ed interpretazione dei risultati

Gli amplificati devono essere corsi su gel d'agarosio al 2% TAE.

La lunghezza dell'amplificato è 150bp.

Il saggio viene validato se il controllo HPV positivo è positivo e il controllo negativo (Acqua RNase-free) non presenta bande.

Norme di sicurezza

Vengono seguite tutte le indicazioni riportate nell'allegato 10: Istruzione Operativa Buona Pratica

Reagenti


Reagente	Conservazione	Produttore/codice
dNTP	Freezer -20C	ROCHE / Cat No.03 622 614 001
GeneAmp 10X PCR Buffer II	Freezer -20C	Applied Biosystem / N808-0241
AmpliTaq Gold	Freezer -20C	Applied Biosystem / R09833
MgCl ₂	Freezer -20C	Applied Biosystem / R13271
Acqua RNase-free	Freezer -20C	Qiagen / 1012888
Primers GP5+/GP6+	Freezer -20C	EUROFINS
TAE Buffer	Camera Oscura	AB Analitica

Strumentazione

Thermal Cyclers

Cappa aspirante

Transilluminatore

 ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA	Istruzione operativa	CP005
	HPV TYPING ALLEGATO 13 PCR GP5+/GP6+	Pag. 3 di 3 Ed. 3 Rev. 1
	S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV E BIOLOGIA MOLECOLARE	22/12/2015

Apparato fotografico
Vasca elettroforetica.

Bibliografia

1. Ana-Maria de Roda Husman, Jan M. M. Walboomers, Adriaan J. C. van den Brule, Chris J. L. M. Meijer and Peter J. F. Snijders The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR *Journal of General Virology* (1995), 76, 1057-1062.