

**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 il sequenziamento del DNA di HPV.

### **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 coinvolt nella genotipizzazione HPV afferenti ad ISPO.

### **3. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA'**

Il responsabile delle seguenti azioni è il Biologo, strutturato e non, operante nella sezione e addetto agli esami di biologia molecolare.

#### **Preparazione del campione**

Il segmento di DNA amplificato con primer specifici (gli stessi utilizzati per la reazione di amplificazione):

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

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

(vedi istruzione operativa 7) dopo la corsa su gel di agarosio 2% in TAE viene purificato.

#### **Protocollo di purificazione del prodotto PCR con QIAquick PCR Purification kit Qiagen**

1. Aggiungere 5 volumi di Buffer PB ad un volume di amplificato in una provetta da 1.5 ml (Es. aggiungere 200 µl di Buffer PB a 40 µl di prodotto di PCR)
2. Preparare una colonnina QIAquick spin column per ogni campione da purificare, posizionata sul tubo di raccolta
3. Per legare il DNA, applicare il campione alla colonnina e centrifugare per 1 minuto a 13000rpm
4. Eliminare il filtrato e posizionare la colonnina sullo stesso tubo di raccolta
5. Per lavare la colonnina, aggiungere 750 µl di Buffer PE e centrifugare per 1 minuto a 13000rpm
6. Eliminare il filtrato e posizionare la colonnina sullo stesso tubo di raccolta. Centrifugare per 1 minuto a 13000rpm, per eliminare il residuo di Buffer PE
7. Posizionare la colonnina in una provetta da 1.5 ml
8. Per eluire il DNA, aggiungere al centro della membrana della colonna da 30 a 50 µl di acqua (quantità variabile in base all'intensità dell'amplificato), aspettare un minuto e centrifugare per 1 minuto a 13000rpm
9. Elettroforesi su gel di agarosio al 2% di 5 µl di purificato per stabilire la quantità necessaria per la reazione di marcatura (quantità variabile tra 1 e 6 µl).

Preparare la mix per la reazione di marcatura:

Reagenti	Stock conc.	Conc lavoro	Volume /PCR
Volume DNA templato			1 – 6 µl
5X Sequencing Buffer	5X	5X	4 µl
Terminator Ready Reaction Mix ABI PRISM Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit			2 µl
Primer GP5+/GP6+ Forward o Reverse	100 µM	3.2 µM	1. µl
Acqua RNase-free			q.b.
Tot mix di reazione			20 µl

- 1) Numerare i tubi di PCR da 0,2 secondo lo schema di lavoro e preparare la mix singolarmente per ciascun campione
- 2) Mettere i tubi di PCR nella macchina di PCR e far partire il saggio usando il seguente protocollo di amplificazione:

96°C per 10 sec  
50°C per 5 sec  
60°C per 1 min

} 25 cicli

4°C fino all'utilizzo della reazione di marcatura nella successiva fase di rimozione dei Big Dye terminator non incorporati (mediante precipitazione con etanolo e sodio acetato o mediante gel-filtrazione in colonnine in resina).

Questo tipo di reazione può essere eseguito nel termociclato i-cycler (Biorad), my-cycler (Biorad), 9700 Applied Biosystems; 2720 Applied Biosystem: assicurarsi prima dell'uso che il thermal cycler sia calibrato (vedi istruzioni calibrazione indicate).

La reazione di marcatura deve essere conservata a 4°C per un tempo non superiore ad una settimana.

#### Precipitazione con etanolo e sodio acetato

Trasferire la reazione di marcatura in tubini da 0.5 ml sterili ed aggiungere:

3 µl di sodio acetato 2M

50 µl di etanolo 95%

- ✓ Vortexare e lasciare incubare da un minimo di 15 min ad un massimo di 24 ore.
- ✓ Centrifugare a 13.000rpm per 20 min.
- ✓ Eliminare il sovraccarico ed aggiungere 250 µl di etanolo 70%.
- ✓ Vortexare e centrifugare a 13.000rpm per 5 min.
- ✓ Eliminare il sovraccarico.

- ✓ Essiccare il pellet (invisibile) nella PCR a 90°C per 1 min con il tappo aperto.
- ✓ Aggiungere 25 µl del tampone di corsa TSR (APPLIED Biosystems) e vortexare.
- ✓ Denaturare il campione nella PCR a 95°C per 2 min (tappo chiuso).
- ✓ Mettere subito i campioni in ghiaccio.
- ✓ Centrifugare per pochi secondi a 5.000rpm.

Trasferire 11 µl del campione marcato e risospeso negli appositi tubini da 0.5 ml. Chiudere con tappi sterili di gomma con foro centrale (Applied Biosystems).

#### Gel-filtrazione in colonnine in resina

Purificazione della reazione di sequenza con DyeEx 2.0 Spin kit Qiagen

1. Agitare la colonnina per risospendere la resina.
2. Svitare il tappo della colonnina di circa un quarto di giro.
3. Staccare la chiusura inferiore della colonnina e posizionarla su un tubo di raccolta da 2ml.
4. Centrifugare per 3 minuti a 3000rpm.
5. Trasferire con attenzione la colonnina su una provetta da 1.5ml. Depositare lentamente i 20µl del prodotto della reazione di marcatura al centro della superficie della resina, senza toccare la resina. Non importa rimettere il tappo alla colonnina.
6. Disporre nella centrifuga le colonnine con la stessa inclinazione che avevano nella prima centrifugata (cioè con la punta della superficie della resina verso l'esterno).
7. Centrifugare per 3 minuti a 3000rpm.
8. L'eluito è il purificato da analizzare al sequenziatore.

#### Reagenti

Reagente	Conservazione	Produttore/codice
Buffer PB	Temperatura ambiente	Qiagen / 1015089
Buffer PE	Temperatura ambiente	Qiagen / 1015210
QIAquick spin column	Temperatura ambiente	Qiagen / 1018215
5X Sequencing Buffer	Frigo 4° C	Applied Biosystem / 4336397
Terminator Ready Reaction Mix ABI PRISM Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit	Freezer -20C	Applied Biosystem / 4336768
Primers GP5+/GP6+	Freezer -20C	Eurofins
Agarosio	Temperatura ambiente	SIGMA / EC 232-731-8
TAE Buffer	Temperatura ambiente	AB Analitica
Sodio Acetato	Temperatura ambiente	SIGMA / EC 204-823-8
Etanolo	Temperatura ambiente	Carlo Erba 414605
DyeEx 2.0 Spin Column	Temperatura ambiente	Qiagen / 1020001

#### Preparazione del sequenziatore ABI PRISM 310

- ✓ Accendere prima il sequenziatore e poi il computer collegato.
- ✓ Aprire il programma ABI PRISM 310 Collection.

- ✓ Aprire le due porte del sequenziatore.
- ✓ Per prima cosa si lavano attentamente tutti i componenti in plastica e gomma con acqua corrente calda aiutandosi con una siringa di plastica per lavare all'interno delle fessure e quindi abbondantemente con acqua distillata.
- ✓ La siringa va smontata e rimontata facendo attenzione all'anello di gomma nero da riposizionare all'estremità della siringa.
- ✓ Si asciuga tutto perfettamente.
- ✓ Si mettono a temperatura ambiente polimero e buffer con EDTA 10X.
- ✓ Si preparano 15 ml di buffer 1X: 1.5 ml di buffer 10X e 13.5 ml di acqua distillata.

#### Montaggio regione del blocco di plexiglas

- ✓ Si richiama dal programma ABI PRISM 310 Collection, Manual Control e si apre la valvola del buffer.
- ✓ Si inserisce il blocco di plexiglass nella guida e le valvole nelle tre fessure.
- ✓ Si chiude la valvola del buffer, si stringono le altre valvole eccetto quella del capillare.
- ✓ Si mette il buffer diluito nella giara che alloggia l'anode buffer e si posiziona la giara sull'anodo.

#### Montaggio del capillare e dell'elettrodo

- ✓ Il capillare viene pulito con etanolo assoluto ed un fazzoletto di carta di marca nella zona della finestra di quarzo e solo in quella.
- ✓ Si monta il capillare.
- ✓ Si passa il capillare nella fessura della valvola apposita e solo a questo punto si stringe bene la valvola del capillare.
- ✓ Si passa quindi il capillare nel detector plate facendo attenzione a posizionare la camera di quarzo nella fessura da cui passa il laser (detector window).
- ✓ Si chiude il detector door.
- ✓ Il capillare va piegato a formare un'ansa sull'Heat Plate e fatto entrare nel supporto circolare terminale.
- ✓ L'elettrodo è alloggiato in questo supporto circolare e ogni due - tre mesi dovrebbe essere rimosso e pulito con un po' di acqua distillata.
- ✓ Si fa arrivare il capillare all'altezza dell'elettrodo o due tre mm più in basso dell'elettrodo e si ferma il capillare con due pezzi di scotch thermal tape.
- ✓ Si prende la siringa pulita e asciutta, si infila nella fessura apposita e si avvita bene. Si apre la sola valvola del buffer (da Manual control) mentre le altre valvole sono chiuse e si aspira con il pistone un po' di buffer che risale dalla giara dell'anodo, fino a passare di pochi mm la Luer valve.
- ✓ Si chiude la valvola del buffer.
- ✓ Si toglie la siringa e si riempie di polimero POP6 sotto cappa.
- ✓ Si rimette la siringa nel suo alloggio, si avvita e si apre la sola Luer valve.
- ✓ Si spinge con l'indice il polimero fino a raggiungere il fronte del buffer e si fa risalire il polimero frammisto a buffer fino alla valvola, che quindi viene chiusa.

- ✓ Si posiziona il siringe Drive Toggie in direzione della siringa e da Manual control > Syringe down fino a raggiungere il pistone della siringa a contrasto.
- ✓ Aspettare che dal capillare fuoriesca una goccia di polimero.
- ✓ Nel frattempo aggiungere acqua distillata e buffer 1X in provette di vetro alloggiate nel contenitore posto al di sotto di capillare ed elettrodo.
- ✓ L'acqua distillata occupa il posto 2 mentre il buffer il posto 1. I due contenitori vengono tappati con tappini di plastica bianchi con foro centrale.
- ✓ Anche nel posto 3 viene messa una provetta eppendorf da 1.5 ml contenente acqua distillata.
- ✓ Fare partire da Manual control un Seq fill capillary in modo che il polimero contenuto nel capillare non vada mai a secco. Appena il capillare s'immerge nell'acqua terminare il Seq fill capillary.

Tutte le volte che viene cambiato un capillare o pulito l'elettrodo deve essere rifatta la procedura di allineamento del capillare seguendo le istruzioni del computer dal programma ABI PRISM 310 Collection > Instrument > Autosampler calibration.

### Sequenziamento

Si imposta la corsa di sequenza sul computer attraverso il programma ABI PRISM 310 Collection: New File

Sample sheet 48 posti

Si iscrivono i nomi dei campioni

Si salva la lista dei campioni (sample sheet)

New File

Injection list

Si richiama la lista dei campioni che sono stati preparati.

- ✓ Si impostano i tempi di corsa (da 10 a 36 minuti in base alla lunghezza del frammento da sequenziare) e i tempi di iniezione (da 10 a 60 sec in base alle aspettative della marcatura: più intensa risulta la marcatura = minore deve essere il tempo di iniezione del campione).
- ✓ Le prime due o tre corse devono essere Seq fill capillary nel caso sia un capillare nuovo, ma maggiore è il numero delle corse del capillare e maggiore deve essere il numero dei Seq fill capillary. E' inoltre sempre utile inserire un Seq fill capillary almeno ogni 6-7 campioni e in fondo alla corsa.
- ✓ La reazione di sequenza non deve partire se dopo i Seq fill capillary la prova CCD 4 colour dà valori maggiori di 2000-3000 nella linea di base corrispondenti ai 4 fluorocromi.
- ✓ Altri Seq fill devono essere aggiunti anche se durante la prova CCD 4 colour (che dura 5 min. e deve essere interamente seguita) si presentano dei picchi di intensità elevata.
- ✓ I campioni vengono conservati in frigo o in freezer, dove possono permanere non più di 3 giorni prima di essere esaminati. Al momento della corsa vengono denaturati e accuratamente tappati. Questa fase è critica perché, se la provetta non è accuratamente tappata, viene compromesso l'esito dell'esame. I campioni vengono così posizionati nel provettario posto al di sotto del capillare e del buffer.
- ✓ Si fa partire la corsa della sequenza.

- ✓ Le corse vengono analizzate nel programma Sequencing analysis che il computer lancia automaticamente appena parte una corsa di sequenza.
- ✓ Le corse possono essere visualizzate da Sequencing analysis, Sample manager, oppure possono essere richiamate da ABI PRISM, Run, corsa della data che si vuole visualizzare.

**Allegato 15: Innolipa Schede di sicurezza (MSDS INNO-LiPA)  
Consultabili nella stanza 67 a del LRPO**



**Manufacturer / Supplier:**

**INNOGENETICS N.V.**  
Technologiepark 6  
B-9052 Ghent - BELGIUM  
Tel: +32-9-329.13.29  
Fax: +32-9-329.19.11  
<http://www.innogenetics.be>  
**BTW BE 0427.550.660**  
**RPR Gent**

10.05.2010

**Kit components**

Product code	Description
81063	INNO-LiPA HPV Genotyping Extra <20T,CE>

**Components:**

Article code	Article description	Datasheet version
56718	DENAT SOLN	4
57420	HYDBRIDIZ SOLN	3
57421	STRIN WASH SOLN	3
56721	RINSE SOLN 5x	3
56951	CONJ DIL	3
56952	CONJ 100x	3
56953	SUBS BUF	3
56954	SUBS BCIP/NBT 100x	4

Le versioni precedenti di questa Scheda possono comunque essere fornite su richiesta.

**Allegato 16**

# **TRAINING MANUAL**

## **Auto-LiPA 48**

**Innogenetics Srl**  
Via del Mare 36  
00040 Pomezia (Roma)  
☎ 06 91180375  
✉ 06 91180400

Questo manuale operativo è un'agevole guida per eseguire rapidamente un test INNO-LIPA sullo strumento automatico Auto-LIPA 48. Assicuratevi di aver letto il manuale operativo completo prima di iniziare ad utilizzare la prima volta Auto-LIPA 48.

## Accensione

- Premere l'interruttore ON/OFF situato sul retro dello strumento..
- Attendere fino a che lo strumento si posiziona in modalità stand-by e sul display appare:



- L'Auto-LiPA 48 è pronto per iniziare l'esecuzione di un test

## ✓ Collocazione degli accessori

- Alloggiare i tubi di scarico normale (etichettato in nero) e quello di scarico speciale (non etichettato) nelle appropriate bottiglie sul lato sinistro dello strumento.
- Riempire le due bottiglie del sistema di riscaldamento con acqua distillata. Aggiungere acqua fino alla linea di demarcazione rossa nella bottiglia per acqua calda, fino alla linea blu nella bottiglia per acqua fredda. Infilare queste bottiglie negli appositi rivestimenti isolanti e posizionarle nello strumento, quindi inserire i tubi etichettati HW1, HW3, CW1 e CW3. Mettere i coperchi isolanti sopra ai rivestimenti delle bottiglie.

### Attenzione:

- Rimuovere e pulire i filtri dei tubi di distribuzione HW1, HW3, CW1 e CW3 prima di ogni uso.
- Controllare il livello di liquido nelle bottiglie dell'acqua distillata calda e fredda ad ogni utilizzo.

## ✓ Selezione del test

- Premere il tasto "SI" quando il display è in modalità standby.
- Appare il messaggio "Bott. SCARTI OK?". Controllare a premere "SI" per confermare.
- Il successivo messaggio "Contr. FILTRI" vi ricorderà di controllare che i filtri non siano ostruiti.
- Selezionare sul messaggio seguente la metodica che desiderate effettuare utilizzando i tasti + e - . Possono essere selezionati i seguenti test:

HLA56V3 per i test INNO-LiPA HLA

CFV4 per i test INNO-LiPA CFTR

HPV1 per il test INNO-LiPA HPV ed i test INNO-LiPA HBV

RIFTBV3 per i test INNO-LiPA MYCOBACTERIA e INNO-LiPA RIFTB

APOEV3 per il test INNO-LiPA APOE

- controllare l'elenco dei test disponibili nel manuale ricevuto con lo strumento
- Premere "SI" per confermare la vostra selezione.
- Controllare e confermare la temperatura di ibridazione del test sul display premendo "SI". Lo strumento è pronto per iniziare il test.

## ✓ Preparazione dei reagenti

- Posizionare le bottiglie dei reagenti Hybridization Solution (HS) e Wash Solution (WS) del kit INNO-LiPA negli appositi contenitori metallici. Mettere i contenitori sull'incubatore (rispettivamente SW sul fondo e HS sul davanti), e inserire i tubi con i corrispondenti colori e numeri come indicato in tabella:

Reagenti INNO-LIPA	Tubo n°	Codice Colore Tubo
Hybridization Solution	1	Verde
Stringent Wash	2	Blu

### Attenzione:

- Verificare che i tubi siano immersi nella soluzione e non siano piegati!!

- Per N campioni occorrono i seguenti volumi:

Reagenti INNO-LIPA	Diluizione	Volume da preparare
Hybridization Solution	Pronto all'uso	(N x 2 ml) + 10 ml
Stringent Wash Solution	Pronto all'uso	(N x 2 ml) + 10 ml
Rinse Solution	1/5 in H <sub>2</sub> O	(N x 12 ml) + 10 ml
Conjugate	1/100 in Conjugate Diluent	(N x 2 ml) + 10 ml
Substrate Buffer	Pronto all'uso	(N x 2 ml) + 10 ml
Substrate	1/100 in Substrate Buffer	(N x 2 ml) + 10 ml

### Esempio per 5 campioni:

RS = 70 ml, diluizione 1/5 (14 ml di RS + 56 ml H<sub>2</sub>O)

C = 20 ml, diluizione 1/100 (200 µl di C + 20 ml CD)

SB = 20 ml

S = 20 ml, diluizione 1/100 (200 µl di S + 20 ml SB)

### Attenzione:

- Per sedute con pochi campioni, il volume di 10 ml in eccesso per il coniugato (Conjugate), per il tampone substrato (Substrate Buffer) e per il substrato (Substrate) può essere ridotto se vengono usati recipienti conici tipo Falcon.

### Esempio:

- utilizzando un contenitore conico da 50 ml: 5 ml in eccesso di reagente
- utilizzando un contenitore conico da 15 ml: 3 ml in eccesso di reagente
- Riempire i recipienti con i corretti reagenti e inserire i tubi con i colori e numeri corrispondenti. Posizionare i contenitori nello strumento in corrispondenza dei punti colorati.

I colori e i numeri corrispondenti sono:

Reagenti INNO-LIPA	Numero del tubo	Codice Colore del tubo
Rinse Solution	3	Aranclone
Conligate	4	Rosso
Substrate Buffer	5	Bianco
Substrate	6	Giallo

### ✓ Aggiunta dei campioni e avvio del test

- Attendere che lo strumento mostri l'avviso "INSERISCI VASSOIO" per preparare i campioni.
- Utilizzare delle pinzette di plastica per posizionare il numero occorrente di strisce LiPA (dopo averle siglate con una matita) nella parte inferiore della vaschetta del vassoio, con la marker line in direzione della parte superiore del vassoio.
- Pipettare 10 µl di Denaturation Solution (DS) nell'angolo superiore della vaschetta per ogni campione e miscelare più volte con 10 µl di prodotto di PCR.
- Caricare il vassoio nell'Auto-LiPA 48 e chiudere il copri vassoio per mezzo dei tre morsetti neri e delle due chiusure a farfalla
- Chiudere il coperchio frontale dello strumento e premere un tasto qualsiasi

#### Attenzione:

- Assicurarsi che il vassolo sia alloggiato correttamente nello strumento.
- Definire i seguenti parametri prima di cominciare:
  1. PosIniz. Striscia 1: indica la posizione sul vassolo in cui è stata alloggiata la prima striscia. Le possibili posizioni di partenza sono: 1, 4, 7...
  2. Nr di Strisce 30: indicare, muovendosi con le frecce, il numero di strisce che devono essere testate (1 - 30)
  3. Ultima Aspirazione?: indicare se lo strumento deve eseguire automaticamente l'aspirazione della rinse al termine dell'ultimo passaggio

#### Attenzione:

- Quando si effettua un test overnight, è preferibile rimandare l'ultima aspirazione e lasciare le strisce immerse nella Rinse Solution.
- Se il coperchio dello strumento non è chiuso, non è possibile procedere!
- Proc 1: INC: Confermare premendo "SI" che il primo passaggio del test è un'incubazione.

## ✓ Pulizia dell'Auto-LiPA 48

- L'Auto-LiPA 48 deve essere pulito con acqua distillata dopo ogni utilizzo e una volta alla settimana utilizzando una soluzione di lavaggio.  
Può essere utilizzata la seguente soluzione: 2% SDS + 0.1%TWEEN-20 riscaldato a 60°C o etanolo al 70%.
- Partendo da "ESEGUI PROG." in modalità standby, selezionare il menu "Prepar. Liquido" utilizzando i tasti "<" o ">". Confermare con "SI".
- Procedere fino al messaggio "Pulizia Autom.", sempre utilizzando "<" o ">", e confermare.
- Quando appare "PUL LIQUIDO", mettere tutti i tubi dei reagenti in acqua distillata o nella soluzione di lavaggio e premere "SI" per confermare.
- Mettere o lasciare i tubi in acqua distillata quando appare il messaggio "ACQUA DISTILL", e confermare.
- Il messaggio successivo è "Pulitura Vasca". Quando completato, confermare di continuare premendo un tasto qualsiasi.
- Al messaggio "RIMUOVI ACQUA", i tubi devono essere rimossi dall'acqua distillata. Quando si conferma il messaggio, i tubi verranno svuotati.

### **Attenzione:**

- dopo l'uso settimanale della soluzione di lavaggio, utilizzare il programma Pulizia Autom. due volte per rimuovere ogni traccia della soluzione di lavaggio.

## ✓ Procedure standard di manutenzione

### PROCEDURE GIORNALIERE:

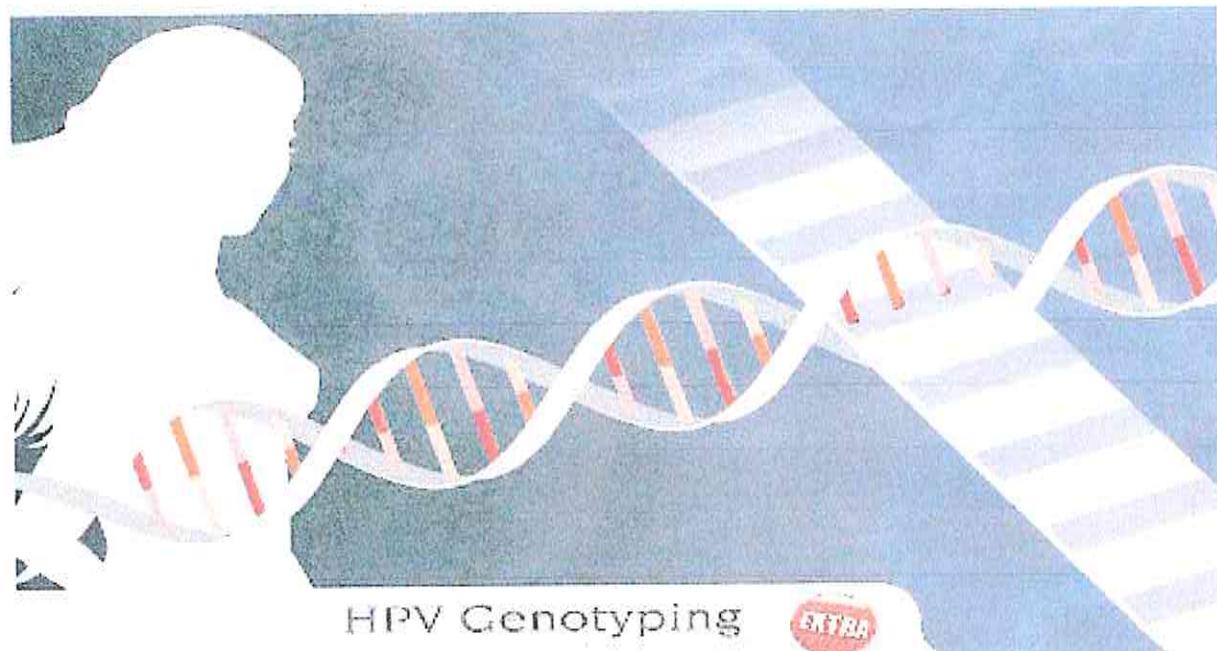
- Cambiare i liquidi nelle bottiglie isolanti di acqua calda e fredda prima dell'utilizzo del giorno. Riempire solo con acqua distillata. Ricontrollare il livello di liquido delle bottiglie di acqua calda e fredda prima di ogni utilizzo e se necessario portare a volume con acqua distillata.
- Controllare se i filtri metallici dei tubi inseriti nelle bottiglie dell'acqua calda e fredda sono ostruiti da sporcizia o polvere. Questo controllo dovrebbe essere fatto prima dell'esecuzione di ogni test.
- Assicurarsi che il fondo del vassoio sia libero da polvere o residui prima di essere inserito nel suo alloggio (porre il vassoio su di una superficie pulita e priva di polvere quando si caricano le strisce).
- Se lo strumento resta inutilizzato, inserire un vassoio e chiudere il coperchio per impedire che entri polvere nell'alloggio del vassoio.
- Impostare il programma "Pulizia Autom." per lavare tutto il sistema dopo ogni utilizzo.

### ***PROCEDURE SETTIMANALI:***

- Lavare il display, il coperchio e il compartimento per le bottiglie con un detergente. **NON USARE ACETONE!**
- Usare la seguente soluzione di lavaggio (70% etanolo o 2% SDS + 0.1% Tween, quest'ultimo scaldato a 60°C) una volta alla settimana, per pulire tutto il sistema mediante il programma "Pulizia Autom.". Successivamente effettuare due cicli del programma "Pulizia Autom." con acqua distillata, per rimuovere ogni traccia della soluzione di lavaggio.

Allegato 17: Manuale sistema LIRAS lettura strisce  
Consultabile nella stanza 67 a del LRPO

# LiRAS™ for LiPA HPV



## Manual



BI00234 Rev0

## Allegato 18 CP005

 <b>AB ANALITICA® s.r.l.</b> ADVANCED BIOMEDICINE www.abanalitica.it	<b>DIAGNOSTICI IN VITRO</b> <b>SCHEDA DI SICUREZZA</b> AQ-HPV-TYPE_EXPRESS_msds_I20140515	Pagina 1 di 2
---	---	---------------

### SCHEDA DI SICUREZZA

Stampata il 15/05/2014

Revisione N° 5 del 15.05.2014

Il prodotto AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS non è soggetto alla redazione della SCHEDA DATI DI SICUREZZA in quanto regolamentato dalla direttiva 98/79/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 27 ottobre 1998, relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro in accordo al comma 11 del REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006

#### 1 – Identificazione del dispositivo medico-diagnostico in vitro e della società

Nome del prodotto: AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS

Codice del prodotto: 03-35A-20

Società: **AB ANALITICA s.r.l.**  
Via Svizzera 16,  
Tel 049/761698 Fax 049/8709510  
35127 Padova  
ITALIA

#### 2-Identificazione dei pericoli

L'unico componente pericoloso è la soluzione DEN Soluzione di denaturazione pronta all'uso  
Contiene NaOH < 2% di cui si allega la relativa SDS

#### 3- Composizione/ingredienti

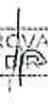
Nome del prodotto: AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS

CAS: nessuno

EINECS: nessuno

#### Componenti:

DESCRIZIONE	ETICHETTA
Mastermix contenente reagenti di amplificazione	HPV-TYPE EXPRESS MIX
DNA plasmidico contenente parte del genoma di HPV 61	PC HPV 61
Strisce di nitrocellulosa con sonde specifiche adese	STRIP HPV
Soluzione di denaturazione pronta all'uso Contiene NaOH < 2%	DEN Xi:irritante  R 36/37/38 S26
Soluzione di Ibridazione pronta all'uso	HYB-1
Soluzione di Diluizione del Coniugato	CON-D1
Streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina	CON
Soluzione di Risciacquo pronta all'uso	RIN
Substrato: soluzione NBT/BCIP pronta all'uso	NBT/BCIP

PREPARATO DA: 	VERIFICATO DA: 	APPROVATO DA: 	
--	---	--	--



**AB ANALITICA®**  
s.r.l.  
ADVANCED BIOMEDICINE  
www.abanalitica.it

**DIAGNOSTICI IN VITRO**  
**SCHEDA DI SICUREZZA**

AQ-HPV-TYPE\_EXPRESS\_msds\_i20140515

*Pagina 2 di 2*

**Soluzione di Bloccaggio pronta all'uso**  
Contiene Acido citrico < 0,5%

**STOP**

**Altre informazioni**

**GARANZIA** Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La società AB ANALITICA non potrà essere ritenuta responsabile per qualsiasi danno derivante dall'impiego o al contatto con il prodotto di cui sopra.

PREPARATO DA:	VERIFICATO DA:	APPROVATO DA:		
RAQ	SAQ	DIR		

**1. Identificazione della sostanza/miscela e della società/dell'impresa**  
**Informazioni sul prodotto**

*Numero di catalogo:* 03-35A-20

*Nome del prodotto:* AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS  
DEN [BOX R]

*Utilizzazione della sostanza/miscela:* Kit per genotipizzazione di acidi nucleici

*Società:* AB ANALITICA, via Svizzera 16 – 35127 PADOVA  
Tel +39 049 761698 - Fax +39 049 8709510

*Numero telefonico di emergenza:* Tel. 02 66101029  
Centro Antiveleni Ospedale Niguarda  
Servizio attivo 24 ore su 24.  
<http://www.centroantiveleni.org/>

*Persona responsabile/redattore:* qualita@abanalitica.it

**2. Identificazione dei pericoli**

**Classificazione della sostanza o della miscela**

**Classificazione GHS**

Irritazione oculare, Categoria 2

H319: Provoca grave irritazione oculare.

Irritazione cutanea, Categoria 2

H315: Provoca irritazione cutanea.

**Classificazione CE**

Xi; R36/38

Per il testo completo delle frasi R menzionate in questa sezione, vedi sezione 16.

**Elementi dell'etichetta**

**Etichettatura GHS**

**Pittogrammi di pericolo**



*Avvertenza*

Attenzione

*Indicazioni di pericolo*

H315: Provoca irritazione cutanea.

H319: Provoca grave irritazione oculare.

*Consigli di prudenza*

P302 + P352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P305 + P351 + P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

**Etichettatura ridotta (≤ 125 mL)**  
*Pittogrammi di pericolo*



Avvertenza  
 Attenzione

**Etichettatura secondo Direttive CE**



Simbolo: Xi Irritante  
 Frasi "R": 36/38 Irritante per gli occhi e la pelle.  
 Frasi "S": 26 In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

**Etichettatura ridotta (≤ 125 mL)**



Simbolo: Xi Irritante

**Altri pericoli**  
 Nessuno(a).

### 3. Composizione/informazione sugli ingredienti

**Natura chimica**

Soluzione acquosa.

#### Componenti pericolosi

##### *Sodio idrossido*

<b>Nº CAS</b>	<b>Nº CE</b>	<b>Nº INDICE</b>	<b>Classificazione</b>	<b>concentrazione</b>
1310-73-2	215-185-5	011-002-00-6	Corrosione cutanea Categoria 1A, H314	≥ 0.1 % - < 2.0 %
			C, R35	

Per il testo completo dei codici H e delle frasi R menzionate in questa sezione, vedi sezione 16.

### 4. Misure di primo soccorso

*Dopo inalazione:* aria fresca.

*Dopo contatto con la pelle:* lavare abbondantemente con molta acqua. Togliere gli indumenti contaminati. Consultare un medico.

*Dopo contatto con gli occhi:* sciacquare abbondantemente con acqua tenendo la palpebra aperta. Chiamare immediatamente un oculista.

*Dopo ingestione:* NON indurre il vomito. Non somministrare alcunché a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.

---

## 5. Misure antincendio

### *Mezzi di estinzione idonei*

Utilizzare sistemi estinguenti compatibili con la situazione locale e con l'ambiente circostante.

### *Pericoli specifici contro l'incendio*

Non combustibile.

In caso di incendio può liberare vapori pericolosi.

### *Equipaggiamento speciale di protezione per gli addetti all'estinzione degli incendi*

Non sostare nella zona di pericolo senza autonomo respiratore. Allo scopo di evitare contatti con la pelle, tenere un'adeguata distanza di sicurezza ed usare adatti indumenti di protezione.

### *Ulteriori informazioni*

Eliminare gas/vapori/nebbie con getti d'acqua. Evitare che l'acqua degli estintori contamini le acque di superficie o le acque di falda.

---

## 6. Misure in caso di rilascio accidentale

### *Precauzioni individuali*

Non respirare vapori, aerosol. Evitare il contatto con la sostanza. Prevedere una ventilazione adeguata.

### *Precauzioni ambientali*

Non gettare i residui nelle fognature.

### *Procedure e materiali per il contenimento e la raccolta a scopo di pulizia*

Raccogliere con materiale liquido assorbente e neutralizzante. Smaltire. Pulire l'area interessata.

---

## 7. Manipolazione e immagazzinamento

### *Manipolazione*

#### *Avvertenze per un impiego sicuro*

Osservare le indicazioni sull'etichetta.

### *Immagazzinamento*

#### *Informazioni supplementari per le condizioni di stoccaggio*

Ben chiuso.

Conservare da 2°C a 8°C.

Questi dati si applicano all'intero KIT!

---

## 8. Controllo dell'esposizione / protezione individuale

### *Componenti con limiti di esposizione*

#### *Componenti*

Base	Valore	Parametri di controllo	Valore limite assoluto, Osservazioni
<i>Sodio idrossido (1310-73-2)</i>			
OEL (IT)	Valore massimo	2 mg/m <sup>3</sup>	

### *Protezione individuale*

Proteggere il corpo con mezzi appropriati al tipo ed alla concentrazione del rischio esistente sul posto di lavoro. Chiarire con il fornitore la resistenza ai prodotti chimici dei mezzi di protezione.

### *Protezione respiratoria*

Richiesta quando siano generati vapori/aerosol.

**Tipo di filtro suggerito: Filtro B-(P2)**

**Protezione delle mani**

**Materiale dei guanti:**

I guanti protettivi da usare devono rispettare le specifiche della direttiva EC 89/686/EEC e lo standard EN 374.

La scelta dei guanti adatti non dipende soltanto dal materiale bensì anche da altre caratteristiche di qualità variabili da un produttore a un altro. Poiché il prodotto rappresenta una formulazione di più sostanze, la stabilità dei materiali dei guanti non è calcolabile in anticipo e deve essere testata prima dell'impiego.

**Tempo di permeazione del materiale dei guanti:**

Richiedere al fornitore dei guanti il tempo di passaggio preciso che dovrà essere rispettato.

**Protezione degli occhi**

**Occhiali di sicurezza.**

**Misure di igiene**

Togliere immediatamente gli indumenti contaminati. Applicare una crema protettiva per la pelle.

Lavare le mani ed il viso dopo aver lavorato con la sostanza.

---

## 9. Proprietà fisiche e chimiche

Stato fisico	liquido
Colore	incolore
Odore	inodore
Valore di pH (20°C)	nessun dato disponibile
Viscosità, dinamica	nessun dato disponibile
Punto di ebollizione	nessun dato disponibile
Temperatura di accensione	nessun dato disponibile
Punto di infiammabilità	nessun dato disponibile
Proprietà comburenti	nessun dato disponibile
Infiammabilità	nessun dato disponibile
Limite di esplosività, inferiore	nessun dato disponibile
Limite di esplosività, superiore	nessun dato disponibile
Pressione di vapore	nessun dato disponibile
Densità di vapore relativa	nessun dato disponibile
Densità a 20 °C	1.016 g/cm <sup>3</sup>
Solubilità	nessun dato disponibile
Idrosolubilità a 20 °C	solubile
Coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua	nessun dato disponibile
Velocità di evaporazione	nessun dato disponibile

---

## 10. Stabilità e reattività

**Stabilità chimica**

Stabile nelle condizioni di stoccaggio raccomandate.

**Condizioni da evitare**

Nessun dato disponibile.

**Materiali da evitare**

Agenti ossidanti forti, Acidi forti, Materie organiche.

**Prodotti di decomposizione pericolosi**

Nessuna informazione disponibile.

## 11. Informazioni tossicologiche

Valori LD/LC50 rilevanti per la classificazione:

1310-73-2 Idrossido di Sodio (sostanza pura)

Orale

LD50

500 mg/kg (coniglio)

Effetto irritante per gli occhi

Draize test

2000 mg/kg (ratto)

++ (coniglio)

*Inhalazione*

Sintomi: irritazione delle mucose, tosse, mancanza di respiro.

*Ingestione*

Sintomi: se ingerito, provoca irritazioni delle mucose della bocca, della faringe, dell'esofago e della zona gastrointestinale.

*Pelle*

Provoca irritazione cutanea.

*Occhi*

Provoca irritazione oculare.

*Ulteriori informazioni*

Manipolare rispettando le buone pratiche di igiene industriale e di sicurezza adeguate.

## 12. Informazioni ecologiche

*Tossicità per i pesci*

1310-73-2 Idrossido di Sodio (soluzione 50%) (IUCLID)

Valori CL50

Specie: *Oncorhynchus mykiss* (Trota iridea)

Dosi: 45,4 mg/l

Tempo di esposizione: 96 h

nessun dato disponibile

*Persistenza e degradabilità*

Nessun dato disponibile

*Potenziale di bioaccumulo*

Nessun dato disponibile

*Mobilità nel suolo*

Nessun dato disponibile

*Valutazione PBT e vPvB*

Nessun dato disponibile

*Altri effetti nocivi*

Effetto dannoso dovuto alla variazione del pH.

Non permettere il contatto con fonti d'acqua potabile, acque di scarico o suolo!

## 13. Considerazione sullo smaltimento

*Prodotto*

I prodotti chimici devono essere eliminati in conformità alle leggi vigenti.

*Contenitori contaminati*

Smaltimento secondo le normative nazionali. Gli imballi contaminati devono essere maneggiati con le stesse cautele usate per le sostanze pericolose. Gli imballi non contaminati possono essere trattati o riciclati come rifiuti non pericolosi se non diversamente indicato.

## 14. Informazioni sul trasporto

*ADR/RID*

Numero ONU: 1824 Classe: 8 Gruppo d'imballaggio: III

Nome di spedizione appropriato: IDROSSIDO DI SODIO IN SOLUZIONE

**DEN**

Data di revisione 21.06.2010

**IMDG**

UN-Number: 1824      Class 8      Packing group: III      EMS-No: F-A, S-B  
Proper shipping name: SODIUM HYDROXIDE SOLUTION  
Marine pollutant: No

**IATA**

UN-Number: 1824      Class: 8      Packing group: III  
Proper shipping name: SODIUM HYDROXIDE SOLUTION

Questi dati si applicano all'intero KIT!

---

**15. Informazioni sulla regolamentazione**

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) N° 1907/2006.

---

**16. Altre informazioni**

*Testo del/i codice/i H e frase/i R menzionate nelle Sezioni 2 e 3*

H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
R35	Provoca gravi ustioni.
R36/38	Irritante per gli occhi e la pelle.
Xi	Irritante.
C	Corrosivo.

*Informazioni sulla revisione*

Data e numero della revisione: 21/06/2010

Revisione precedente:      prima stesura (rev. 0)

Motivo della revisione:      non applicabile

*Fonti*

Dir. 67/548/CEE e successive modifiche ed adeguamenti.

Dir. 1999/45/CE e successive modifiche.

Regolamento (CE) N° 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006, REACH.

Regolamento (CE) N° 1272/2008, del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008, CLP, e successive modifiche.

Globally Harmonized System, GHS.

D.Lgs. 81/2008 e successive modifiche.

*Legislazioni sulle Schede di Sicurezza*

Scheda di Sicurezza in accordo con l'Allegato I del Regolamento (UE) N. 453/2010.

*Ulteriori informazioni*

Le informazioni qui contenute sono basate sull'attuale stato di conoscenza. Esse caratterizzano il prodotto con riferimento alle appropriate precauzioni di sicurezza. Non rappresentano una garanzia sulle proprietà del prodotto.

Allegato 19: Manuale d'uso Ampliquity test  
Consultabile nella stanza 67 a del LRPO



# Manuale d'uso

## AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS

v.3.0

cod. 03-35A

Sistema rapido di identificazione  
e tipizzazione del Papilloma Virus Umano  
mediante PCR *single step* e  
Reverse Line Blot



AQ-HPV-TYPE\_EXPRESS\_manual\_I20140416

**Allegato 20: Manuale d'uso Ampliquality test Autoblot 3000h**  
**Consultabile nella stanza 67 a del LRPO**



*MANUALE D'USO*

**AB DIALUX**

**AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v. 2.0**  
**AMPLIQUALITY HPV-TYPE**  
cod. 08-RLB-02

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

Versione software 1.1.0  
23/05/2013



**Allegato 21: Manuale d'uso Ampliquality test scanner e software  
Consultabile nella stanza 67 a del LRPO**



***GUIDA GENERALE PER IL SOFTWARE***

***AB DIALUX***

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

Versione software 1.4.0  
30/03/2015

**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**

Third Edition

June 2012

## **QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook**

For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, cultured cells, swabs, and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only)



Sample & Assay Technologies

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

June 2012

## QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook

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



Sample & Assay Technologies

COGNOME NOME  
VIA/PIAZZA AAAAAAAA 1  
50100 FIRENZE

**RICERCA E TIPIZZAZIONE PAPILLOMAVIRUS UMANO (HPV)**

**E' stata evidenziata la presenza di:**

HPV 16

Il Biologo

Il sistema utilizzato permette l'identificazione dei seguenti tipi di HPV:

16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 26, 53, 66, 68, 70, 73, 82, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81

Data	giorno/mese/anno
N. registro	xxx
Tipo materiale	CERVICO VAGINALE

COGNOME E NOME  
INDIRIZZO  
CITTA'

**RICERCA E TIPIZZAZIONE PAPILLOMAVIRUS UMANO (HPV)**

**Non è stata evidenziata la presenza di Papilloma Virus**

Il Biologo

Il sistema utilizzato permette l'identificazione dei seguenti tipi di HPV:

16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 26, 53, 66, 68, 70, 73, 82, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81

Data giorno/mese/anno  
N. registro xxx  
Tipo materiale CERVICO VAGINALE

**cognome e nome  
indirizzo  
indirizzo**

**RICERCA E TIPIZZAZIONE PAPILLOMAVIRUS (HPV)**

**L'esame ha dato il seguente esito:**

<u><input checked="" type="checkbox"/> Ricerca HPV</u>	<u>POSITIVO</u>
<u><input checked="" type="checkbox"/> HPV alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59</u>	<u>NEGATIVO</u>
<u><input checked="" type="checkbox"/> HPV rischio intermedio: 26, 53, 66, 68, 70, 73, 82</u>	<u>NEGATIVO</u>
<u><input checked="" type="checkbox"/> HPV basso rischio: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81</u>	<u>NEGATIVO</u>

**TIPO SPECIFICO NON ULTERIORMENTE TIPIZZABILE**

Il Biologo

Data giorno/mese/anno  
N. registro xxx  
Tipo materiale cervico vaginale

**cognome e nome**

**indirizzo**

**indirizzo**

**RICERCA E TIPIZZAZIONE PAPILLOMAVIRUS (HPV)**

Tipi testati: HPV alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

HPV rischio intermedio: 26, 53, 66, 68, 70, 73, 82

HPV basso rischio: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81

**NON VALUTABILE**

Il Biologo

Data giorno/mese/anno  
N. registro xxx  
Tipo materiale cervico vaginale

**SCHEDA PROCESSO DI TIPIZZAZIONE**

N° REGISTRO	CODICE PAZIENTE	TIPO CAMPIONE	ESTRAZIONE		PCR		TYPING		NOTE *	RIP.* REF. ***	sigla biologo
			DATA	OPERATORE	DATA	OPERATORE	DATA	OPERATORE			
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											

\* se richiesta PCR β-globina o altro segnalare anche su registro attività

\*\* se richiesta ripetizione

\*\*\* referito

## ALLEGATO 26 CP005

ID_SAMPLE		RISULTATO HC2 TEST Pos neg HR HC2 HR HC2 RLU/CO ..... LR HC2 LR HC2 RLU/CO.....  Se HC2 neg      SI   NO 10% neg random																																					
Data prelievo:																																							
<b>STOCCAGGIO</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA																																						
<b>ESTRAZIONE</b>																																							
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA																																						
<b>AMPLIFICAZIONE</b>																																							
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
MACCHINA PCR UTILIZZATA																																							
INNOLIPA	ALTRO:																																						
<b>TIPIZZAZIONE</b>																																							
DATA:	OPERATORE																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
INNOLIPA	ALTRO:																																						
TIPI: _____																																							
NOTE: _____																																							
<b>PRIMERS SINGOLI</b> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td></td> <td>DATA</td> <td>OPERATORE</td> </tr> <tr> <td>HPV:</td> <td>NEG</td> <td>POS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>HPV:</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GH20/PC04;</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GP5+/6+</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>betaglobina+</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </table>						DATA	OPERATORE	HPV:	NEG	POS		HPV:	_____	_____	_____	GH20/PC04;	_____	_____	_____	GP5+/6+	_____	_____	_____	betaglobina+	_____	_____	_____												
		DATA	OPERATORE																																				
HPV:	NEG	POS																																					
HPV:	_____	_____	_____																																				
HPV:	_____	_____	_____																																				
HPV:	_____	_____	_____																																				
HPV:	_____	_____	_____																																				
GH20/PC04;	_____	_____	_____																																				
GP5+/6+	_____	_____	_____																																				
betaglobina+	_____	_____	_____																																				
<b>RIPETIZIONI</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						

ID_SAMPLE		RISULTATO HC2 TEST Pos neg HR HC2 HR HC2 RLU/CO ..... LR HC2 LR HC2 RLU/CO.....  Se HC2 neg      SI   NO 10% neg random																																					
Data prelievo:																																							
<b>STOCCAGGIO</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA																																						
<b>ESTRAZIONE</b>																																							
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA																																						
<b>AMPLIFICAZIONE</b>																																							
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
MACCHINA PCR UTILIZZATA																																							
INNOLIPA	ALTRO:																																						
<b>TIPIZZAZIONE</b>																																							
DATA:	OPERATORE																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
INNOLIPA	ALTRO:																																						
TIPI: _____																																							
NOTE: _____																																							
<b>PRIMERS SINGOLI</b> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td></td> <td>DATA</td> <td>OPERATORE</td> </tr> <tr> <td>HPV:</td> <td>NEG</td> <td>POS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>HPV:</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GH20/PC04;</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GP5+/6+</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>betaglobina+</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </table>						DATA	OPERATORE	HPV:	NEG	POS		HPV:	_____	_____	_____	GH20/PC04;	_____	_____	_____	GP5+/6+	_____	_____	_____	betaglobina+	_____	_____	_____												
		DATA	OPERATORE																																				
HPV:	NEG	POS																																					
HPV:	_____	_____	_____																																				
HPV:	_____	_____	_____																																				
HPV:	_____	_____	_____																																				
HPV:	_____	_____	_____																																				
GH20/PC04;	_____	_____	_____																																				
GP5+/6+	_____	_____	_____																																				
betaglobina+	_____	_____	_____																																				
<b>RIPETIZIONI</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						

**RISULTATO FINALE:**

NOTE: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

<b>ID_SAMPLE</b>		RISULTATO HC2 TEST Pos neg HR HC2 HR HC2 RLU/CO ..... LR HC2 LR HC2 RLU/CO.....  Se HC2 neg SI NO 10% neg random																																					
<b>Data prelievo:</b>																																							
<b>STOCCAGGIO</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA <b>ESTRAZIONE</b>																																						
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA <b>AMPLIFICAZIONE</b>																																						
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
MACCHINA PCR UTILIZZATA																																							
INNOLIPA	ALTRO: <b>TIPIZZAZIONE</b>																																						
DATA:	OPERATORE																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
INNOLIPA	ALTRO:																																						
TIPI: _____																																							
NOTE: _____																																							
<b>PRIMERS SINGOLI</b> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">NEG</td> <td style="text-align: center;">POS</td> <td style="text-align: center;">DATA</td> <td style="text-align: center;">OPERATORE</td> </tr> <tr> <td>HPV: _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GH20/PC04: _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GP5+/6+ _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>betaglobina+ _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </table>				NEG	POS	DATA	OPERATORE	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	GH20/PC04: _____	_____	_____	_____	GP5+/6+ _____	_____	_____	_____	betaglobina+ _____	_____	_____	_____
NEG	POS	DATA	OPERATORE																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
GH20/PC04: _____	_____	_____	_____																																				
GP5+/6+ _____	_____	_____	_____																																				
betaglobina+ _____	_____	_____	_____																																				
<b>RIPETIZIONI</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						

**RISULTATO FINALE:**

NOTE: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

<b>ID_SAMPLE</b>		RISULTATO HC2 TEST Pos neg HR HC2 HR HC2 RLU/CO ..... LR HC2 LR HC2 RLU/CO.....  Se HC2 neg SI NO 10% neg random																																					
<b>Data prelievo:</b>																																							
<b>STOCCAGGIO</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA <b>ESTRAZIONE</b>																																						
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
N.SCATOLA	POSIZ.SCATOLA <b>AMPLIFICAZIONE</b>																																						
DATA:	OPERATORE:																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
MACCHINA PCR UTILIZZATA																																							
INNOLIPA	ALTRO: <b>TIPIZZAZIONE</b>																																						
DATA:	OPERATORE																																						
N.LOTTO	EXP DATE																																						
INNOLIPA	ALTRO:																																						
TIPI: _____																																							
NOTE: _____																																							
<b>PRIMERS SINGOLI</b> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">NEG</td> <td style="text-align: center;">POS</td> <td style="text-align: center;">DATA</td> <td style="text-align: center;">OPERATORE</td> </tr> <tr> <td>HPV: _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GH20/PC04: _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>GP5+/6+ _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> <tr> <td>betaglobina+ _____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </table>				NEG	POS	DATA	OPERATORE	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	HPV: _____	_____	_____	_____	GH20/PC04: _____	_____	_____	_____	GP5+/6+ _____	_____	_____	_____	betaglobina+ _____	_____	_____	_____
NEG	POS	DATA	OPERATORE																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
HPV: _____	_____	_____	_____																																				
GH20/PC04: _____	_____	_____	_____																																				
GP5+/6+ _____	_____	_____	_____																																				
betaglobina+ _____	_____	_____	_____																																				
<b>RIPETIZIONI</b>																																							
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						
DATA	OPERATORE																																						
Campione	intero	diluito																																					
PCR + Typing	Risultato:																																						

**RISULTATO FINALE:**

NOTE: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

REPORT Tracciabilità Seduta ANALITICA HPV TYPING Routine

Da N° reg \_\_\_\_\_ a N° reg \_\_\_\_\_

**PCR (Allegato 6 CP005)**

Data 1 \_\_\_\_\_ n. campioni \_\_\_\_\_ operatore (nome) \_\_\_\_\_

Data 2 \_\_\_\_\_ n. campioni \_\_\_\_\_ operatore (nome) \_\_\_\_\_

**RLB (Allegato 6 CP005)**

Data \_\_\_\_\_ n. campioni \_\_\_\_\_

**Controlli interni (Allegato 6 della CP005)**

	Risultato atteso	anomalia	
K+ PCR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ (specificare)
CE estrazione	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ (specificare)
Bianco PCR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ (specificare)

**Scansione strip (allegato 6 della CP005)**

Non effettuata \_\_\_\_\_ (motivazioni)

Effettuata in Data \_\_\_\_\_ Seduta N° \_\_\_\_\_ (n° foglio di lavoro dialux) n. campioni \_\_\_\_\_

Operatore (nome e sigla) \_\_\_\_\_

**Validazione risultati seduta (Allegato 8 della CP005)**

Data \_\_\_\_\_ Biologo Dirigente (nome e sigla) \_\_\_\_\_

Esito complessivo \_\_\_\_\_  
(i dettagli di ciascun campione devono essere riportati su registro e foglio di lavoro autoblot)

**NOTE** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



HPV typing

Allegato 29

Pag. 1 di 9

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAAsymphony DSP

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

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

## 2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione operativa deve essere applicata dal personale afferente alla 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'

L'estrazione automatica del DNA viene eseguita con QIAAsymphony DSP Virus/pathogen Midi kit (Qiagen, catalog. no. 937055) (il manuale d'uso Allegato 30), 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.

Possono essere estratti fino a 24 campioni per seduta, poiché il rack di eluizione è da 24 posti.

### **3.1 Preparazione dei campioni**

I kit QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen sono studiati per essere utilizzati con un'ampia gamma di campioni, fra cui plasma, siero, FCS, nonché campioni respiratori e urogenitali. Evitare la formazione di schiuma all'interno o sui campioni.

In base al materiale iniziale utilizzato, può essere necessario pre-trattare i campioni per fluidificarlo.

I campioni devono essere termostatati a temperatura ambiente (15–25°C) prima di avviare la procedura. La preparazione del campione 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 (all.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) disponibile 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

HPV typing

Allegato 29

Pag. 2 di 9

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAasympathy DSP

Ed. 3 Rev. 1

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

22/12/2015

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.

**3.1.1 Estrazione del DNA da campioni cervicali in STM**

Aliquotare 200 ul di campione nella provetta apposita da 2ml\*, aggiungere 400 ul di buffer ATL e agitare per spipettamento.

**3.1.2 Estrazione materiale cervico-vaginale prelevato in THIN PREP o saccomanno**

Aliquotare 600 ul di campione nella provetta apposita da 2ml\*.

**3.1.3 Estrazione da URINA**

Aggiungere 500ul di buffer ATL al pellet (in 100ul di PBS) delle urine, fresco o congelato, e agitare per spipettamento. Trasferire nella provetta apposita da 2ml\*.

**3.1.4 Estrazione da sperma**

Aliquotare 200 ul di sperma fresco se il DNA viene estratto in giornata, o congelato se è stato pretrattato al momento dell'arrivo – vedi allegato 2 “Fase Pre-analitica: conservazione e pretrattamento campioni biologici”. Aggiungere 400 ul di buffer ATL e agitare per spipettamento. Trasferire nella provetta apposita da 2ml\*.

Se il campione è almeno 1200 ul, estrarre da un'aliquota di 600 ul (quindi senza che sia necessario aggiungere ATL), e conservare l'altra aliquota nel caso fosse necessario ripetere l'estrazione.

\* Tubes, conical, 2ml, QSYM AS (500) Qiagen 997102

(Stesse provette per aliquota campioni e per eluizione DNA)

***Attenzione al volume di campione!***

Il kit midi estrae il DNA da 400ul di campione, ma ne necessita di almeno 500ul.

Se il volume non è sufficiente, lo strumento non estrae il campione e lo dà invalido.

I campioni aliquotati nelle apposite provette da 2ml\* devono essere stappati e alloggiati negli appositi adattatori (Tubi 3B) e poi posizionati nel rack porta campioni dello strumento QIAasympathy SP. *Fare attenzione a incastrare bene gli adattatori nel rack e le provette negli adattatori.*

HPV typing  
Allegato 29

Pag. 3 di 9

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAasympathy DSP

Ed. 3 Rev. 1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV  
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

## PER TUTTI GLI ALTRI TIPI DI CAMPIONE

Consultare il biologo per valutare se possibile applicare il protocollo automatico o se necessario procedere con l'estrazione manuale (all. 5).

**3.2 Conservazione e manipolazione dei reagenti**

I reagenti per la purificazione del DNA sono contenuti in una cartuccia reagenti (RC). Ciascun recipiente della cartuccia reagenti (RC) contiene un particolare reagente, cioè particelle magnetiche, tampone di lisi, tampone di lavaggio oppure tampone di eluizione. I kit QIAasympathy DSP Virus/Pathogen devono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C). Le particelle magnetiche nelle cartucce reagenti (RC) rimangono attive se conservate a questa temperatura. Non conservare le cartucce reagenti (RC) a temperature inferiori a 15°C. Eventuali cartucce reagenti (RC) utilizzate solo parzialmente possono essere conservate per una durata massima di 4 settimane, chiuse con gli appositi tappi, a temperatura ambiente (15–25°C).

ATTENZIONE ALLA SCADENZA: lo strumento non lo segnala se scaduto

Per evitare l'evaporazione dei reagenti, la cartuccia reagenti (RC) deve rimanere aperta al massimo per 15 ore (compreso il tempo di processazione) ad una temperatura ambiente massima di 30°C. 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).

**3.3 Purificazione automatizzata sul sistema QIAasympathy SP**

**3.3.1** Accendere il sistema QIAasympathy SP e attendere finché la procedura di inizializzazione non è terminata.

L'interruttore di alimentazione è collocato nell'angolo inferiore sinistro dello strumento QIAasympathy SP.

**3.3.2** Eseguire il login nello strumento: supervisor > pw carozzi1 + ok.

**3.3.3 Caricamento del cassetto “Eluate”**

Caricare il rack per eluizione contenente le provette da 2ml senza tappo\* identificate con gli id dei campioni da estrarre nel cassetto “Eluate”, nello “Slot di eluizione 1”, che ha il corrispondente adattatore di raffreddamento.

*Importante.* L'ordine delle provette di eluizione nel rack è A1, B1, C1, D1, A2, B2, ..., cioè in verticale. Chiudere il cassetto.

Selezionare sullo schermo lo slot 1 cliccandoci sopra. Da Configure, selezionare il tipo di provette di eluizione: Tube 2ml> sar#72.693 T2.0 screw: lo slot 1 sullo schermo diventa giallo.

Da Rack ID digitare il nome della seduta (data di estrazione), e dare ok.

Lo strumento fa la scansione.

HPV typing

Allegato 29

**Pag. 4 di 9**Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAAsymphony DSP**Ed. 3 Rev. 1****S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV  
E BIOLOGIA MOLECOLARE****22/12/2015**

\* Tubes, conical, 2ml, QSYM AS (500) Qiagen 997102  
(Stesse provette per aliquota campioni e per eluizione DNA)

### **3.3.4 Caricamento del cassetto Waste - “Materiali di scarto”**

Due box unitari vuoti dei sample cartrige e degli 8- rod cover vengono riposti in appositi nel cassetto “Waste”.

Sul lato anteriore del cassetto “Waste” attaccare un sacchetto per raccogliere i puntali con filtro usati. Se necessario, sostituire il sacchetto.

Nota: Il sistema non verifica la presenza di un sacchetto per lo smaltimento dei puntali. Accertarsi che il sacchetto per lo smaltimento dei puntali sia correttamente attaccato prima di avviare l'esecuzione di un protocollo.

Un contenitore di scarico raccoglie i residui liquidi prodotti durante la procedura di purificazione. Il cassetto “Waste” si chiude solo se il contenitore dei residui liquidi è inserito. Smaltire i residui liquidi in conformità con le normative di sicurezza e ambientali locali vigenti in materia.

Chiudere il cassetto e fare la scansione (“scan”).

Dare ok per uscire dallo schermo Waste.

### **3.3.5 Caricamento dei consumabili nel cassetto “Reagents and Consumables”**

Caricare i box con i sample cartrige per la preparazione dei campioni, gli 8-rod cover, i puntali con filtro monouso da 200  $\mu$ l (disposti nei rack blu) e da 1.500  $\mu$ l (disposti nei rack grigi) nel cassetto “Reagents and Consumables”.

Nota: Accertarsi che i coperchi dei box unitari vengano rimossi prima di caricare i box nel cassetto “Reagents and Consumables”.

Nota: I puntali sono provvisti di filtri per impedire la cross-contaminazione.

Gli slot dei rack per puntali sul piano di lavoro del QIAAsymphony SP possono essere occupati da qualsiasi tipo di rack per puntali. Il sistema QIAAsymphony SP identificherà il tipo di puntale caricato durante la scansione di inventario.

Il sistema QIAAsymphony SP è in grado di utilizzare rack per puntali e box unitari parzialmente utilizzati.

HPV typing

Allegato 29

Pag. 5 di 9

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAsymphony DSP

Ed. 3 Rev. 1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV  
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

## Required plasticware

	One batch, 24 samples*	Two batches, 48 samples*	Three batches, 72 samples*	Four batches, 96 samples*
Disposable filter-tips, 200 $\mu$ l <sup>†</sup>	34	60	86	112
Disposable filter-tips, 1500 $\mu$ l <sup>‡</sup>	123	205	295	385
Sample prep cartridges <sup>§</sup>	18	36	54	72
8-Rod Covers <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Use of more than one internal control per batch and performing more than one inventory scan requires additional disposable filter-tips. Use of less than 24 samples per batch decreases the number of disposable filter-tips required per run.

† There are 32 filter-tips/tip rack.

‡ Number of required filter-tips includes filter-tips for 1 inventory scan per reagent cartridge.

§ There are 28 sample prep cartridges/unit box.

¶ There are twelve 8-Rod Covers/unit box.

### 3.3.6 Caricamento delle cartucce reagenti (RC) nel cassetto “Reagents and Consumables”

Prima di avviare la procedura, accertarsi che le particelle magnetiche siano completamente risospese. Rimuovere il recipiente delle particelle magnetiche dal telaio della cartuccia reagenti, agitarlo vigorosamente su vortex per almeno 3 minuti, riposizionarlo nel telaio della cartuccia reagenti prima dell'uso e togliere la pellicola d'alluminio.

Controllare che i tamponi QSL2 e QSB1 non contengano un precipitato. Se necessario, rimuovere i recipienti contenenti i tamponi QSL2 e QSB1 dalla cartuccia reagenti e incubarli per 30 minuti a 37°C agitandoli di tanto in tanto per sciogliere il precipitato. Evitare di agitare energicamente la cartuccia

HPV typing

Allegato 29

Pag. 6 di 9

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAAsymphony DSP

Ed. 3 Rev. 1

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

22/12/2015

reagenti (RC) per prevenire la formazione di schiuma che potrebbe compromettere il rilevamento del livello del liquido.

Collocare la cartuccia reagenti sul relativo supporto grigio.

Quando si utilizzi una cartuccia reagenti per la prima volta, posizionare il coperchio perforante (pearcing leads) sulla cartuccia reagenti, facendogli fare un piccolo scatto da entrambi i lati.

Se si utilizza una cartuccia reagenti già parzialmente utilizzata, rimuovere i tappi sigillanti.

Collocare il rack per enzimi (ER) lateralmente sul supporto della cartuccia reagenti e aprire le provette; conservare i tappi per la chiusura delle provette alla fine della seduta.

Scrivere sulla cartuccia la data di utilizzo e il numero di campioni estratti.

Le cartucce reagenti (RC) utilizzate solo parzialmente possono essere conservate fino al successivo utilizzo, chiuse con gli appositi tappi.

Si procede caricando la cartuccia reagenti (RC) nel cassetto "Reagents and Consumables", nell'apposito alloggiamento più verso l'interno dello strumento.

### **3.3.7 Caricamento del buffer ATL**

Controllare se si è formato del precipitato nel tampone ATL. Se necessario, scioglierlo riscaldando il tampone a 70°C e agitandolo delicatamente in un bagno d'acqua. Aspirare le bolle d'aria dalla superficie del tampone ATL.

Nella schermata "R+C" premere il pulsante "Bottle ID" e scansionare il codice a barre del flacone del tampone ATL con l'apposito scanner dei codici a barre esterno. Premere "OK".

Accertarsi che il flacone del tampone ATL aperto venga collocato nel cassetto Reagents and Consumables nella posizione apposita alla destra della cartuccia reagenti.

Chiudere il cassetto.

### **3.3.8 Scansione dei reagenti e consumabili e verifica quantità.**

Eseguire la scansione del cassetto. L'operazione richiede circa 10 minuti.

Dopo lo scan, dalla finestra R + C selezionare "Samples Calc" e selezionare protocollo utilizzato Pathogen > **Complex400\_V4\_DSP default IC**: lo strumento calcola i campioni che è possibile eseguire con il materiale caricato. Dare OK.

### **3.3.9 Preparazione delle miscele di carrier RNA-tampone AVE**

Nota: Si raccomanda vivamente di utilizzare il carrier RNA (CARRIER). Se non si aggiunge il carrier RNA, il recupero degli acidi nucleici può risultare notevolmente ridotto.

Per preparare una soluzione madre contenente il carrier RNA (CARRIER), aggiungere 1.350 µl di tampone AVE (fornito in flaconcini da 2 ml) alla provetta contenente 1.350 µg di carrier RNA liofilizzato in modo da ottenere una soluzione di 1 µg/µl. Sciogliere completamente il carrier RNA (CARRIER), dividerlo in aliquote di opportune dimensioni e conservarlo a 2–8°C al massimo per 4 settimane.

HPV typing

Allegato 29

Pag. 7 di 9

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAasympathy DSP

Ed. 3 Rev. 1

S.S. LABORATORIO REGIONALE HPV  
E BIOLOGIA MOLECOLARE

22/12/2015

**3.3.10 Preparazione della miscela di carrier RNA-AVE per provetta**

Per 1 campione: 3ul RNA carrier + 115ul buffer AVE

Il volume minimo di miscela di carrier RNA –tampone AVE deve essere in eccesso per tenere conto della perdita di liquido dovuta al pipettaggio e all’evaporazione.

**Calcolo quantità di mix carrier RNA-AVE (in eccesso)**Dal software Qiasymphony management consol > IC calculator  
ACS (assay control set) > **Complex400\_V4\_DSP\_default IC**

Inserire numero di campioni

Elution volume &gt; 85ul

Labware &gt; sar#72.693 T2.0 screw

Internal control = 0

+ calculate

+ print

Preparare la miscela in una o due provette\*\* da 2ml (Sample tubes CB 2ml Qiagen 990382).

La/e provetta/e da 2ml contenente/i la miscela di carrier RNA–tampone AVE viene/vengono collocata/e in un adattatore tube 3B e collocato su un rack porta provette del qiasymphony. *Fare attenzione a incastrare bene gli adattatori nel rack e le provette negli adattatori.*

\*\* Saranno necessarie 1 o 2 provette di miscela carrier RNA-AVE a seconda del numero di campioni da estrarre.

Oppure consultare la scheda IC calculator relativa ai campioni da estrarre (allegata al protocollo)

**3.3.11 Caricamento rack campioni e avvio estrazione**

1. Posizionare il rack porta campioni sul carrello del cassetto Sample fino alla linea nera, e attendere che le frecce verdi inizino a lampeggiare
2. Inserire il rack ad una velocità costante.
3. Se il rack è inserito correttamente le frecce diventano arancioni e il rack viene bloccato.
4. Se l’inserimento non viene eseguito correttamente compare sul touch screen un alert. Rimuovere il rack e premere OK, e inserire di nuovo il rack.
5. Se le provette hanno il barcode questo viene letto dallo strumento, se non ce l’hanno va inserito a mano: cliccare sul batch e poi sul campione e da ID Type selezionare Sample ID e digitare il barcode
6. Se non viene riconosciuto il tipo di provetta, cliccare sopra il campione, e da “Sample tube” > tube 3B > sart 72.693 T2.0 screw
7. Premere Next (le frecce diventano rosse)
8. Premere Select all e selezionare il protocollo di estrazione: Pathogen > **Complex400\_V4\_DSP\_default IC + Next**
9. Selezionare cliccandoci sopra lo slot 1 cioè il rack in cui eluire

HPV typing

Allegato 29

Pag. 8 di 9

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAasympathy DSP

Ed. 3 Rev. 1

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

22/12/2015

10. selezionare il volume di eluizione: 85  $\mu$ l + QUEUE

Dopo aver inserito le informazioni sul batch, lo stato passa da "LOADED" (caricato) a "QUEUE" (in coda).

11. Prima di far partire lo strumento selezionare sullo schermo "E", cliccare sullo slot e premere su View per vedere la posizione dove saranno eluiti i DNA. Cliccando sulla posizione si visualizza Pid del campione.

12. Verificare che tutti i campioni siano celesti (correttamente inseriti)

13. Caricare il rack con la miscela carrier RNA-tampone AVE nello **slot A** del cassetto Sample. Nella schermata Sample preparation cliccare su IC dopo che ha dato loaded, selezionare il tubo e associarci il protocollo richiesto cioè Required > **Complex400\_V4\_DSP\_default IC + ok**

14. Chiudere lo sportello Sample (ma non è necessario)

15. Premere **RUN** e lo strumento parte.

Durata circa 90 minuti per 20 campioni.

### 3.3.13 Fine della seduta

Al termine dell'estrazione, lo stato del batch passa da "RUNNING" a "COMPLETED".

Da Eluate drawer si clicca sulla piastra e da view si verifica che tutti i pozzetti siano verdi. Se gialli significa che durante il processo si è verificato un problema, se rossi non sono accettabili.

Aprire il cassetto 4 e togliere rack con gli eluati.

Chiudere le provette dei DNA con i tappi a vite.

Da Eluate drawer CONFIG + Remove + YES, chiudere il cassetto e poi OK. Lo strumento esegue lo scan

Rimuovere i reagenti e mettere i tappi. Chiudere le provette contenenti la proteinasi K con i tappi a vite e chiudere il tamponcino ATL subito dopo il termine del protocollo per evitare l'evaporazione.

La cartuccia è stabile a temperatura ambiente per 15 ore aperta dentro lo strumento, e per 4 settimane se chiusa con i tappi.

Rimuovere i campioni.

Rimuovere i rifiuti solidi e svuotare la tanica dei rifiuti liquidi.

### 3.3.14 UV

Da TOOL selezionare Maintenance SP e Start UV light + OK (dura 15 minuti)

Eseguire il LOGOUT e spengere lo strumento.

### 3.3.15 Conservazione degli acidi nucleici

Per una conservazione a breve termine che non supera le 24 ore, si consiglia di mantenere gli acidi nucleici purificati a una temperatura di 2–8°C. Per una conservazione a lungo termine che supera le 24 ore, si consiglia una temperatura inferiore a -20°C.

Si consiglia di rimuovere le provette con gli eluati dal cassetto "Eluate" subito dopo il termine del processo. In base alla temperatura e al grado di umidità, le piastre per eluizione rimaste nel sistema QIAasympathy SP dopo il termine del processo possono essere esposte a condensa o evaporazione.



HPV typing

Allegato 29

**Pag. 9 di 9**

Estrazione automatica DNA da  
campioni biologici con  
QIAasympathy DSP

**Ed. 3 Rev. 1**

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

**22/12/2015**

**Allegati da consultare**

- Allegato 30: Istruzioni per l'uso (manuale) del kit QIAasympathy® DSP Virus/Pathogen
- allegato 28: check list prevenzione contaminazione da HPV

**Stumentazione**

Centrifuga

Vortex

Cappa a flusso laminare