

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II***Pozor, změny zvýrazněny****Vyrobeno:**

Fujirebio Europe N.V
Technologiepark 6
9052 Gent
Belgium
☎ +32-9 329 13 29
BTW BE 0427.550.660
RPR Gent

Distribuce:

Asco-Med spol.s r.o.
Pod Cihelnou 6/664
161 00 Praha 6
Česká republika
☎ +420 233 313 578

**[www.e-labeling.eu/ FRI29555](http://www.e-labeling.eu/FRI29555)****☎EUROPE**

GR	+800 135 79 135
IS	00 800 161 220 577 99
LT	800 8996
RO	880 030 728
SK	0800 895 084
TR	0800 606 287
LI	0800 142 064 866
MT	+31 20 796 5692
EE	+31 20 796 5693
	0800 0100 567

☎non-EUROPE

US	+31 20 794 7071
CA	+1 855 236 0910
AR, BR, CO, UY, AU, NZ, RU	+1 855 805 8539
	+800 135 79 135

8:00 – 17:00 GMT+1

M	T	W	T	F	S	S
☒	☒	☒	☒	☒	☐	☐

OBSAH

Použité symboly	2
Použití	3
Princip testu	3
Reagencie	4
<i>Popis, příprava pro použití a doporučené podmínky skladování</i>	4
Dodávané reagencie	4
Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	5
Bezpečnost a životní prostředí	6
Vzorky	7
Poznámky a upozornění	8
Postup přípravy a manipulace	8
<i>Manipulace s proužkem</i>	8
Manuální pracovní postup	8
<i>Pokyny pro inkubaci</i>	8
<i>Pokyny pro výměnu kapaliny ve žlábkách</i>	9
<i>Hybridizace</i>	9
<i>Důkladné promývání</i>	10
<i>Vývoj barvy</i>	10
Automatizovaný pracovní postup	11
Výsledky	11
<i>Odečítání</i>	11
<i>Kontrola kvality</i>	11
<i>Interpretace výsledků</i>	12
Interpretační software: LiRAS for LiPA HPV	13
Omezení postupu	13
Doporučení organizace laboratoře	13
Parametry testu	14
<i>Souhrn</i>	14
<i>Shoda s INNO-LiPA HPV Genotyping Extra</i>	14
<i>LiRAS for LiPA HPV software</i>	15
<i>Přesnost</i>	15
<i>Shoda mezi suspenzí cervikálních buněk a vzorky prvního proudu moči</i>	15
<i>Analytická citlivost</i>	16
Obchodní značky	16

Použité symboly

Výrobce

*In vitro* diagnostický zdravotnický prostředek

Číslo šarže



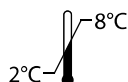
Katalogové číslo



Použitelné do



Podle návodu k použití



Teplotní omezení



Obsah stačí pro <n> testů

CONJ 100x	Conjugate 100x	Konjugát
CONJ DIL	Conjugate diluent	Ředění konjugátu
DENAT SOLN	Denaturation solution	Denaturační roztok
HYBRIDIZ SOLN	Hybridization solution	Hybridizační roztok
RINSE SOLN 5x	Rinse solution 5x	Promývací roztok
STRIN WASH SOLN	Stringent wash solution	Promývací roztok silný
STRIPS	Strips	Stripy
SUBS BCIP/NBT 100x	Substrate BCIP/NBT 100x	Substrát BCIP/NBT 100x
SUBS BUF	Substrate buffer	Substrátový pufr
DANGER	Danger	Nebezpečí
WARNING	Warning	Varování
LiPA	Line Probe Assay	

Použití

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* je „line probe assay“ pro *in vitro* diagnostické použití, kvalitativní detekci a identifikaci genotypu lidského papilomaviru (HPV) pomocí detekce specifických sekvencí na L1 regionu genomu HPV extrahovaných z cervikálních buněk v kapalném mediu nebo prvního proudu moči nebo vzorku tkáně fixovaného formalínem a zalitého v parafínu (FFPE). Jsou detekovány a identifikovány následující genotypy:

- HPV HR*GT: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
- HPV pHR*GT: 26, 53, 66, 70, 73, 82
- HPV LR* nebo neklasifikované GT: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 81, 83, 89

(*) označení HR, pHR, nebo LR je pouze informační a je založeno na publikaci Munoz a kol. (2003) a IARC monografii (Vol. 100B (2012)).

Výsledky testu by měly být použity společně s dalšími klinickými informacemi

Princip testu

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* je založen na principu reverzní hybridizace. Část oblasti L1 (region SPF10) genomu lidského papilomaviru (HPV) je amplifikována specifickými primery HPV a výsledkem toho jsou biotinované amplikony, které jsou potom denaturovány a hybridizovány specifickými oligonukleotidovými próbami. Pro kontrolu kvality vzorku a extrakce je amplifikován i pár primerů lidského genu HLA-DPB1. Všechny próby jsou imobilizovány v paralelních liniích na membránových proužcích. Po hybridizaci a promytí je přidána streptavidinem konjugovaná alkalická fosfatáza, která se váže na předtím vytvořené biotinylované hybridy.

Inkubací s chromogenem BCIP/NBT se vytvoří purpurová sraženina a výsledky mohou být interpretovány vizuálně nebo pomocí softwaru LiRAS pro LiPA HPV.

Pro standardizovanou přípravu biotinylovaného amplifikovaného materiálu lze použít amplifikační sadu (INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* Amp). Tato amplifikační souprava je založena na polymerázové řetězové reakci využívající SPF10 primery. ..

Produkty amplifikace jsou následně hybridizovány za použití jednoho typizovaného proužku, kde je fixováno 32 sekvenčně specifických DNA linií prób a 4 kontrolní linie (viz obrázek 1).

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* assay: jednotlivé kroky:

Krok 1 Amplifikace extrahované DNA.

Krok 2 Hybridizace amplifikovaného produktu na stripu, následovaná důsledným promytím.

Krok 3 přidání konjugátu a substrátu, vedoucí k vývoji barvy.

Krok 4 Vizuelní interpretace vzoru signálů nebo software LiRAS for LiPA HPV.

Reagencie

Popis, příprava pro použití a doporučené podmínky skladování

- Skladovány při 2–8 °C, otevřené nebo neotevřené, v původních lahvičkách, jsou činidla stabilní až do data expirace soupravy. **Nepoužívejte činidla po jejich datu expirace. Žádné z činidel nezmrazujte.**
- Činidla by měla být skladována tak, aby byla chráněna před jakýmkoliv zdrojem kontaminující DNA, zvláště před amplifikačními produkty.
- Všechna činidla a tuby s proužky by měly být vytemperovány na pokojovou teplotu (20–25 °C) asi 60 minut před použitím a měly by být vráceny do chladničky ihned po použití.
- Změny fyzikálního vzhledu reagentů v soupravě mohou znamenat nestabilitu nebo rozklad.
- Aby se minimalizovala možnost, že se proužky před použitím zvlní, doporučuje se skladování tuby ve vodorovné poloze.
- Dodávané reagencie:

<u>Složka</u>	<u>Množství</u>	<u>Ref.</u>	<u>Popis</u>
Proužky	1 x 20	60584	Obsahuje 20 proužků INNO-LiPA HPV Genotyping <i>Extra II</i> označených modrou značkou.
Denaturační roztok (Denaturation Solution)	1 x 1 ml	56718	Alkalický roztok obsahující EDTA. Tato lahvička by se měla ihned po použití uzavřít. Dlouhodobé vystavení tohoto roztoku na vzduchu vede k rychlému zhoršení denaturačních vlastností tohoto roztoku.
Hybridizační roztok (Hybridization Solution)	1 x 80 ml	57420	SSC pufr obsahující laurylsulfát sodný (SLS a 0,01% MIT<0,1%CAA jako konzervant). Hybridizační roztok by měl být předeřhát na teplotu nejméně 37 °C, ale ne vyšší než 49 °C.
Promývací roztok (Stringent Wash Solution)	1 x 200 ml	57421	SSC pufr obsahující laurylsulfát sodný (SLS a 0,01% MIT<0,1%CAA jako konzervant). Hybridizační roztok by měl být předeřhát na teplotu nejméně 37 °C, která však nesmí být vyšší než 49 °C

<u>Složka</u>	<u>Množství</u>	<u>Ref.</u>	<u>Popis</u>
Konjugát 100x (Conjugate 100x)	1 x 0,8 ml	56952	Streptavidin značený alkalickou fosfatázou v Tris pufru obsahujícím stabilizátory proteinů a 0,01% MIT/<0,01% CAA jako konzervační látky. Před použitím se naředí na 1/100 roztokem konjugátu (Conjugate Diluent): Pro každý testovací žlábek se připraví 2 ml pracovního roztoku konjugátu + 2 ml navíc pro manuální testování. Pracovní roztok konjugátu je stabilní po dobu 8 hodin při pokojové teplotě (20–25) °C, pokud se skladuje na tmavém místě.
Rozpouštědlo konjugátu (Conjugate Dil)	1 x 80 ml	56951	Fosfátový pufr obsahující NaCl, detergent, stabilizátory proteinů a 0,01% MIT/<0,1% CAA jako konzervační látky.
Substrát BCIP/NBT 100x (Substrate Buff BCIP/NBT 100x)	1 x 0,8 ml	56954	BCIP a NBT v DMF. Před použitím naředěný na 1/100 substrátem tlumivého roztoku (Substrate Buffer): Pro každý testovací žlábek se připraví 2 ml pracovního roztoku substrátu + 2 ml nadbytku pro manuální testování. Pracovní roztok substrátu je stabilní po dobu 8 hodin při pokojové teplotě (20–25) °C, pokud se skladuje na tmavém místě.
Substrátový pufr (Substrate Buff)	1 x 180 ml	56953	Tris pufr obsahující NaCl, MgCl ₂ a 0,01% MIT/<0,1% CAA jako konzervační látky.
Promývací roztok 5x (Rinse Solution 5x)	1 x 80 ml	56721	Fosfátový pufr obsahující NaCl, detergent a 0,05% MIT/0,5% CAA jako konzervační látky. Před použitím se naředí na 1/5 destilovanou vodou nebo deionizovanou vodou: Pro každý testovací žlábek se připraví 8 ml pracovního promývacího roztoku + 10 ml navíc pro manuální testování. Pracovní promývací roztok je stabilní po dobu 2 týdnů při (2–8 °C).
Inkub. žlábký.	3	-	Inkubační žlábký
Odečítací karty	1	-	Karta pro identifikaci pozitivních linií.
Zápis dat	1	-	Pro skladování vyvíjených proužků.

Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

- INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra Amp.II*
- Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Jednorázové rukavice.
- Jednorázové špičky pipet bez DNA/ DNAsy (odolné vůči aerosolům).
- Chemické kleště pro manipulaci s proužky.
- Odměrné válce (10, 25, 50 a 100 ml).
- Nastavitelné pipety pro pipetování 1–20 µl, 20–200 µl a 200–1 000 µl.
- Třepačka s vířivým pohybem nebo ekvivalentní.
- Mikrocentrifuga.

Materiál potřebný pouze pro manuální postup:

- Vodní lázeň s protřepávací deskou (80 ot./min, se šikmým víkem; teplotou nastavitelnou na 49 °C ± 0,5 °C).

- Odsávací aparát.
- Kalibrovaný teploměr.
- Třepačka s orbitálním pohybem nebo výkyvná třepačka.

Doporučení***Pro třepačku s orbitálním pohybem:***

- Průměr kruhového pohybu by měl být stejný nebo větší než 13 mm.
- Doporučená rychlost pro 13 mm kruhový pohyb je 160 otáček za minutu.

Pro reciproční třepačku:

- Doporučená rychlost pro pohyb je 80 pohybů za minutu.

Pro výkyvnou třepačku:

- Výkyvný úhel by neměl převýšit 13°, aby se zabránilo rozlití kapaliny.
- Doporučená rychlost je 50 otáček za minutu.
- Jednorázová multipipeta (Eppendorf, volitelná).
- Stopky, 2 hodinové (± 1 minuta).

Bezpečnost a životní prostředí

O potenciálně nebezpečných složkách se prosím informujte v Bezpečnostním listu (SDS) a na štítku výrobku. Nejnovější verze bezpečnostního listu (SDS) je dostupná na webové stránce:

www.fujirebio-europe.com

**Danger****DENAT SOLN**

Nebezpečí

H314 P260 P280 P303+P361+P353 P305+P351+P338
P310 P363

**Warning****RINSE SOLN 5x**

Varování

Obsahuje 2-chloracetamid

H317 P261 P280 P333+P313 P362+P364 P302+P352

**Danger****SUBS BCIP/NBT 100x**

Nebezpečí

obsahuje N,N-Dimethylformamid 5,5'Diphenyl-3,3'-
bis(4-nitrophenyl)-2,2'-(3,3'-dimethoxybisphenyl-4,4'ylene)
ditetrazolium dichlorid a methanol
H312+H332 H319 H360D
P201 P261 P280 P303+P361+P353 P305+P351+P338
P308+P313

Údaje o nebezpečí

H312+H332 Škodlivý při styku s kůží a při vdechnutí.
H314 Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
H317 Může způsobit alergickou kožní reakci
H319 Způsobuje vážné podráždění očí
H360D Může poškodit nenarozené dítě

Preventivní opatření

P201 Před použitím si obzarejte speciální pokyny.
P260 Nevdechujte mlhu/ výpary / aerosol

P261	Zabraňte vdechnutí mlhy/ výparu / aerosolu
P280	Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranu očí / ochranu obličeje
P302+P352	NA KŮŽI: Umyjte větším množstvím mýdla a vody
P303+P351+P353	PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou [nebo osprchujte] .
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P308+P313	Při expozici vyhledejte lékaře a získejte lékařské doporučení.
P310	Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO /lékaře/.
P333+P313	Pokud se objeví vyrážka nebo podráždění kůže kontaktujte lékaře.
P362+P364	Sejměte kontaminovaný oděv a před opětovným použitím vyperte.
P363	Kontaminovaný oděv před dalším použitím vyperte.

- Tyto testy by měl provádět pouze odborně proškolený personál.
- Se vzorky by se mělo vždy zacházet jako s potenciálně infekčními. Proto všechny krevní složky a biologické materiály by měly být považovány za potenciálně infekční. a podle toho by se s nimi mělo manipulovat.
- Všechny krevní složky a biologické materiály by měly být likvidovány podle následujících stanovených bezpečnostních postupů:
 - Autoklávem po dobu nejméně 15 minut při 121 °C.
 - Spalováním jednorázového materiálu.
 - Smícháním kapalného odpadu s chlornanem sodným tak, aby konečná koncentrace byla ± 1 % chlornanu sodného. Před likvidací se roztok ponechá stát přes noc.
Upozornění: Před přidáním chlornanu sodného neutralizujte kapalný odpad, který obsahuje kyselinu.
- Pokud manipulujete s nebezpečnými nebo infekčními činidly, je nutné používat: prostředky osobní ochrany: ochranné rukavice a ochranné brýle.
- S odpadem by mělo nakládat podle směrnic instituce o likvidaci odpadů. Měla by být dodržena všechna státní a místní nařízení o ochraně životního prostředí.

Vzorky

Protože INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* test využívá jako vzorek biotinovaný amplifikovaný DNA materiál, je jako amplifikační souprava vhodná INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* Amp, která amplifikuje relevantní DNA ze vzorků:

- (1) Cervikální buňky odebrané do Surepathova média neb do média PreservCyt.

(2) První proud moči s konzervantem

(3) Vzorek tkáně fixovaný formalínem a zalitý v parafínu (FFPE)

Poznámky a upozornění

- Pouze pro odborné používání
- Nemíchejte činidla z různých souprav, pokud nemají složky identická čísla šarže.
- Nepoužívejte opakovaně jednorázový laboratorní materiál.
- Všechny nádoby použité k přípravě roztoků konjugátu a substrátu by měly být důkladně vyčištěny a opláchnuty destilovanou vodou.
- Zabraňte mikrobiální kontaminaci činidel.
- Používejte nové špičky pipet bez DNA/DNasy pro každý alikvotní vzorek. Doporučují se jednorázové pipetovací špičky sterilně balené, odolné aerosolu.

Postup přípravy a manipulace

Manipulace s proužkem

- Proužky jsou určeny pro jedno použití
- Nedotýkejte se proužků holýma rukama; používejte čisté laboratorní kleště.
- Pro identifikaci testovacích stripů používejte **tužku**. Nepoužívejte propisovací tužku apod. Identifikační číslo napište nahoru nad značkovací linii na proužku
- Stripy se umístí do žlábků stranou potaženou membránou nahoru (tato strana je označena).
- Testovací stripy by měly vždy zůstat ve stejném žlábků během celé doby různých inkubačních kroků.
- Nepoužité nebo už vyvinuté stripy by neměly být na intenzivním světle a teple.
- Vyvinuté proužky se před interpretací, pokrytím a skladováním nechají zcela usušit.
- Vyvinuté suché proužky by měly být uchovávány převážně v temnu při pokojové teplotě (20–25 °C).
- Nepoužívejte žlábků opakovaně.

Manuální pracovní postup

Pokyny pro inkubaci

- Hybridizace a inkubace při důsledném promývání by měly být prováděny při **přesně 49 °C** a jsou to nejkritičtější kroky k zabránění falešně pozitivních (teplota je příliš nízká) nebo falešně negativních / velmi slabých signálů (teplota je příliš vysoká). Protřepávací vodní lázeň se **šikmým** víkem umožňuje dobrou kontrolu změn teploty. Je nutná kontrola přesné teploty kalibrovaným teploměrem (do 0,5 °C od nastavené teploty 49 °C).
- Vždy během inkubace **uzavírejte** víko vodní lázně, abyste se vyvarovali falešně pozitivních signálů.
- **Při hybridizaci a promývání nepoužívejte horkovzdušnou třepačku**
- Amplituda pohybu generovaného jak protřepáváním vodní lázně (postup hybridizace a promývání), tak třepačkou s orbitálním pohybem, s oboustranným pohybem nebo výkyvným pohybem (postup pro vyvíjení barvy) je kritická / podstatná pro dosažení maximální citlivosti a homogenity zbarvení.

Amplituda by měla být co největší, tak, aby se ve žlábků jak kapalina, tak zkušební proužky pohybovaly tam a zpět. Avšak musí se zabránit rozstříkávání kapaliny přes okraje žlábků.

- Pro hybridizaci a promývání musí být žlábků umístěny na třepačce vodní lázně. Hladina vodní lázně se nastaví mezi 1/3 až 1/2 výšky žlábků. Ujistěte se, že žlábků neplavou na vodě. Voda by měla být v přímém kontaktu se žlábků.
- Inkubace pro vývoj barvy by měla být prováděna při teplotě mezi 20–25 °C. Jestliže je teplota pod 20 °C, mohou být slabší výsledky, při teplotě nad 25 °C, se může objevit vyšší pozadí a/nebo falešné pozitivní signály.
- Uvedená doba inkubace by měla být přesně dodržována, aby se zajistilo správné provedení testu
- Nezakrývejte žlábků. Během hybridizace a inkubace promýváním mohou být žlábků ve vodní lázni nezakryté. Jejich zakrytí může způsobit křížovou kontaminaci.

Pokyny pro výměnu kapaliny ve žlábků

- Kapalinu odsajte ze žlábků pipetou, nejlépe připojenou na vakuovou odsávačku. Žlábků držte pod úhlem, aby všechna kapalina stekla na jeden konec.
- Do každého žlábků přidejte 2 ml příslušného roztoku podle návodu k použití.

POZNÁMKA: Užitečná je dávkovací multipipeta Multipipette® (Eppendorf).

- Tento krok opakujte tolikrát, kolikrát je uvedeno v protokolu testu.

POZNÁMKA: Nepřipusťte, aby mezi kroky promýváním proužky uschly.

- Ujistěte se, že povrch proužků není během odsávání poškozen. Nejlépe nasávejte kapalinu z horní části proužku nad značkou
- Ujistěte se, že s celý proužek je dobře promyt celkovým ponořením do roztoku
- Pokud je to nutné, upravte rychlost třepačky.

Hybridizace

POZNÁMKA: Noste jednorázové rukavice a používejte chemické kleště.

- Vodní lázeň třepačky zahřejte **přesně na 49 °C**. Teplotu zkontrolujte kalibrovaným teploměrem, a pokud je to nutné, vyregulujte. Hybridization solution (hybridizační roztok) a Stringent Wash solution (promývací roztok) se přehřejí na nejméně 37 °C, ale teplota nesmí přesáhnout 49 °C. Před použitím promíchejte.
- Kleštěmi vyjměte z tuby požadovaný počet testovacích proužků (1 proužek na vzorek) a na horní značku proužku tužkou napište identifikační číslo.
- Vezměte požadovaný počet testovacích žlábků (1 žlábek na 1 proužek) a vložte je do rámečku.
- Pipetujte 10 µl denaturačního roztoku (Denaturation Solution) do horního rohu každého žlábků.

POZNÁMKA: Ihned po použití lahvičku uzavřete.

- Přidejte 10 µl amplifikovaného biotinylovaného produktu do denaturačního roztoku (Denaturation Solution) a opatrně promíchejte několikrát pipetou nahoru a dolů. Vždy použijte špičky pipety bez DNA/DNasy, odolné vůči

aerosolu. Ponechte denaturaci probíhat po dobu 5 minut při pokojové teplotě (20 až 25 °C).

- **Protřepte předeřtý hybridizační roztok a opatrně** přidejte do každého žlábků 2 ml k denaturovanému amplifikovanému produktu. Dejte pozor, abyste během pipetování nekontaminovali sousední žlábků.

Ihned vložte proužek do žlábků označenou stranou nahoře.

Proužky by měly být zcela ponořeny do roztoku.

- Umístěte žlábků v rámečku do vodní lázně třepačky vytemperované na 49 °C (přibližně 80 rpm (ot. za min); viz "Pokyny pro inkubaci"), uzavřete víko a inkubujte po dobu 60 minut.

POZNÁMKA: Zabraňte nastříkání vody z vodní lázně do žlábků. Nastavte hladinu vody mezi 1/3 a 1/2 výšky žlábků.

Důkladné promývání

- Po hybridizaci vyjměte rámeček se žlábků z vodní lázně.
- Rámeček se žlábků držte pod malým úhlem, a kapalinu ze žlábků nasávejte pipetou, nejlépe připojenou na vakuum. Do každého žlábků přidejte 2 ml předeřtého promývacího roztoku (Stringent Wash solution) a promývejte třepáním po dobu 10 až 20 sekund při pokojové teplotě. Odsajte roztok z každého žlábků
- Promývání opakujte ještě jednou (viz "Pokyny pro výměnu kapaliny ve žlábcích").
- Nakonec nasajte roztok a každý proužek inkubujte v 2 ml předeřtého promývacího roztoku (Stringent Wash solution) ve vodní lázni třepačky při 49 °C po dobu 30 minut. Uzavřete víko vodní lázně.

POZNÁMKA: Během inkubace při promývání připravte Rinse solution (promývací roztok) a konjugát (viz "Činidla").

Vývoj barvy

Všechny následující inkubace jsou prováděny při **20 – 25°C v třepačce**.

1. Každá pipeta se promývá dvakrát po dobu 1 minuty 2 ml zředěného promývacího roztoku (Rinse Solution) (viz "Pokyny pro výměnu kapaliny ve žlábcích"). Odsaje se.
2. Do každého žlábků se přidají 2 ml roztoku konjugátu (Conjugate solution) a inkubuje se po dobu 30 minut s protřepáváním. Odsaje se
POZNÁMKA: ca 10 minut před ukončením inkubace konjugátu se připraví roztok substrátu (Substrate solution) (viz "Reagencie").
3. Každý proužek se promývá dvakrát po dobu 1 minuty 2 ml naředěného promývacího roztoku (Rinse solution) a jednou se promyje 2 ml substrátového pufru (Substrate Buffer). Odsaje se.
4. Do každého žlábků se přidají 2 ml roztoku substrátu (Substate solution) a inkubuje se 30 minut s protřepáváním. Odsaje se.
5. Promýváním proužků se zastaví vývoj barvy: dvakrát 2 ml destilované vody, zatímco se protřepává po dobu nejméně 3 minut.
6. Kleštěmi se vyjmou proužky a umístí se na absorpční papír. Proužky se nechají zcela uschnout a zafixují se na listu pro zápis dat. Nahoře je linie značky. Linie

kontroly konjugátu pomáhá správnému nastavení proužku na dokumentačním listu.

Automatizovaný pracovní postup

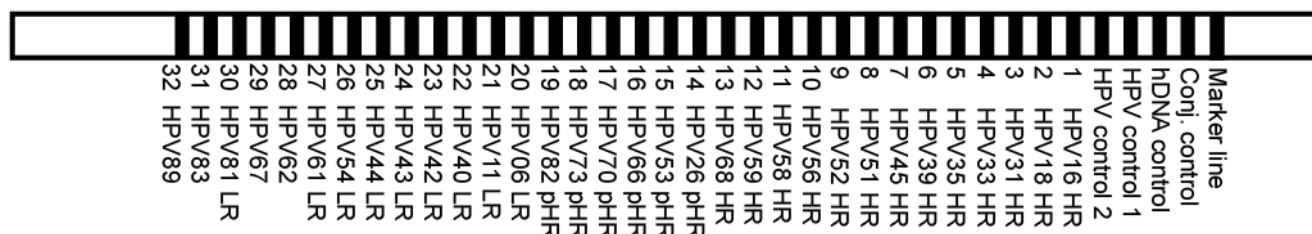
Přístroje a asociované protokoly od Fujirebio Europe N.V najdete na (www.fujirebio-europe.com/automation).

Výsledky

Odečítání

Výsledky by měly být odčítány až ze zcela suchých proužků. Všechny viditelné linie by měly být porovnány s použitím odečítací karty pro INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II –Zarovnáním modré linie značky/ markeru na stripu a na odečítací kartě.

Obrázek 1 ilustruje polohu různých oligonukleotidových prób na proužku INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*. Linie je považována za pozitivní, když se objeví jasná purpurově-hnědá linie po ukončení práce.



Obrázek 1: Umístění specifických prób na proužku INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*, značící linie je pro orientaci přítomna nahoře na proužku. Tato linie je modrá, a tudíž zjevně barevně odlišená od linií INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* stripu.

Kontrola kvality

- První linie (ihned pod označenou linií) je kontrolní linie konjugátu. Tato linie kontroluje přidávání reaktivního roztoku konjugátu a substrátu během postupu detekce. Měla by být vždy pozitivní a měla by mít přibližně stejnou intenzitu na každém proužku ve stejné sérii, Negativní výsledek linie konjugátu svědčí o chybě ve vyvíjení barvy testů. Výsledek by měl být vyhodnocen jako nehodnotitelný a doporučuje se opakování testu LiPA.
- Druhá linie je kontrolní linie lidské DNA. Primery amplifikující fragment humánního genu HLA-DPB1 jsou přidány k soupravě HPV amplifikace, aby monitorovaly kvalitu vzorku a účinnost extrakce. Tato linie by měla být vždy pozitivní, ačkoliv pokud je vysoké množství HPV ve vzorku, je možné, že došlo ke kompetici mezi HPV a lidskou DNA.
- Vždy přidávejte k sérii pozitivní kontrolu: např. pozitivní kontrola amplifikace je zahrnuta v INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp soupravě. Pozitivní kontrola obsahuje PHV6 a HLA-DPB1 a měla by reagovat na následujících liniích: Kontrola konjugátu (Conj.Control), kontrola hDNA (hDNA control), kontrola 1 HPV a linie 20 (HPV6). Pokud se v tomto případě očekávané linie neobjeví, celá série by měla být zlikvidována a měl by se zopakovat celý pracovní postup včetně amplifikace DNA.
- Vždy zařadte do série negativní kontrolu. Ta se provádí současně se vzorky pacienta u DNA extrakce a kroku PCR. Jestliže se získá pozitivní linie (vyjma

pro kontrolu hDNA v případě HPV negativního klinického vzorku) na LiPA pro negativní kontrolu, celá série by se měla vyřadit a měla by se opakovat celá série od DNA extrakce.

Interpretace výsledků

- Vzorek je považován za HPV pozitivní, jestliže nejméně jedna z typicky specifických linií je pozitivní, nebo jedna z HPV kontrolních linií je pozitivní
- Vzorky, které nemají ani jednu ze specifických linií pozitivní, ale vykazují alespoň jednu z HPV kontrol pozitivní, by měly být hodnoceny jako pozitivní, ale netypizovatelné („HPVX“).
- Je-li více než jedna specifická linie pozitivní, jedná se o směs HPV genotypů.
- Vzorek je pokládán za negativní je-li linie hDNA pozitivní a všechny ostatní linie (včetně HPV kontrolních) jsou negativní.
- Jestliže jsou všechny linie HPV negativní a linie hDNA je také negativní měl by se výsledek hodnotit jako neplatný. Takový výsledek může znamenat buď špatný odběr vzorku, zpracování nebo přítomnost inhibitorů v extraktu DNA. V pozdějším testování může ředění 1:10 DNA extraktu zvýšit průběh amplifikace. Není-li tento postup úspěšný, začněte celý postup s novým alikvotem vzorku.
- Pozitivní signál z více než 7 následných linií z 12 na stripu by měl být hodnocen jako možná neplatný. Doporučuje se provést celý postup i s extrakcí DNA. Pokud se takový výsledek objeví podruhé, mohlo by se jednat o správný výsledek genotypizace pro určitou populaci, jako například pro imunokompromitované jedince s mnohonásobnou infekcí.- (* jak byl popsáno Wheelerem a kol. 2006 Human Papillomavirus Genotypes and the Cumulative 2-Year Risk of Cervical Precancer. J.Infect,Dis 2006; 194:1291-1299)

Souhrnná interpretace výsledků stripu:

Tabulka 1 : Souhrnná interpretace výsledků stripu:

Cc linie	Výsledek hDNA	Výsledek HPV	Interpretace
-	+ nebo -	+ nebo -	Neplatný výsledek Negativní výsledek linie konjugátu svědčí o chybě ve vyvíjení barvy testů. Výsledek by měl být vyhodnocen jako nehodnotitelný a doporučuje se opakování testu LiPA.
+	-	-	Platný výsledek v případě negativního kontrolního vzorku Neplatný výsledek v případě lidského vzorku Negativní výsledek na hDNA kontrolní linii indikuje neadekvátní odběr vzorku, zpracování nebo přítomnost inhibitorů v extraktu DNA. V posledním případě testování ředění extraktu 1:10 může zvýšit výkonnost amplifikace. Jestliže není úspěšná, začne postup od nové alikvotní části vzorku HPV
+	+	-	HPV není detekován Negativní výsledek na obou HPV kontrolních liniích a typově specifických liniích indikuje nepřítomnost HPV DNA, ale nemůže vyloučit přítomnost HPV infekce.

+	+ nebo -	+	HPV je detekován Pozitivní výsledek na nejméně jedné z typově specifických linií nebo HPV kontrolních linií indikuje přítomnost HPV DNA. Nepřítomnost dalších HPV genotypů nemůže být zcela prokázána. pokud je vysoké množství HPV ve vzorku, je možné, že linie hDNA je negativní z důvodu kompetice mezi HPV a lidskou DNA
+	+ nebo -	≥7 z 12 následujících linií pozitivní	Neinterpretovatelný výsledek Pozitivní signál z více než 7 následných linií z 12 na stripu by měl být hodnocen jako možná neplatný. Doporučuje se provést celý postup i s extrakcí DNA. Pokud se takový výsledek objeví podruhé, mohlo by se jednat o správný výsledek genotypizace pro určitou populaci, jako například pro imunokompromitované jedince s mnohonásobnou infekcí

Interpretační software LiRAS for LiPA HPV

LiRAS for LiPA HPV software je určen pro pomoc s interpretací výsledků INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II. Prosím kontaktujte místního distributora pro získání poslední verze. Vždy porovnávejte vzor na stripu a informace o pacientovi ve výsledkovém hlášení s původním stripem., abyste se ujistili, že byl strip správně identifikován, přiřazen a skenován.

Omezení postupu

- Použití výrobku by mělo být omezené pouze na osoby které mají zkušenosti s metodou hybridizace.
- Běžné jsou smíšené infekce HPV genotypů. INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* Amp II kit používá sadu primerů, které amplifikují všechny genotypy současně.
- Kvůli kompetici PCR a nepřítomnosti některých genotypů na proužku, může se stát, že určité genotypy přítomné v ko-infikovaném vzorku nejsou detekovány
- Je-li přítomen HPV52 je možná slabá nespecifická reaktivita na linii pro HPV31 z důvodu sekvenční homologie.
- Polymorfismus, přestože se vyskytuje jen výjimečně, může způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledek na jedné z linií prób.

Doporučení organizace laboratoře

Doporučujeme následující pořadí operací:

1. Příprava a dělení/ alikvotování PCR směsí;
2. Příprava vzorků (izolace DNA);
3. PCR Polymerázová řetězová reakce
4. Analýza produktů biotinylovaného produktu PCR reverzní hybridizací.

Personál, kterého se týkají kroky 3 a 4, by se potom neměl ve stejný den podílet na práci pro krok 1 a 2. Podobně poté co provádí krok 2, potom by se neměl ve stejný den podílet na práci pro krok 1.

Aby se zabránilo kontaminaci (např. amplimery) vzorků a vyvarovalo se falešných pozitivních výsledků, měl by se upřednostňovat postup provádění ve třech fyzicky oddělených místnostech, každé s vlastním pomocným a provozním materiálem a pipetami. Jedna místnost je potřeba pro přípravu činidel, další pro přípravu

vzorku a třetí místnost pro amplifikaci a detekci amplimeru. Všechno vybavení by mělo zůstat v té místnosti, kde se používá a nemělo by být přenášeno mezi místnostmi.

Pro pipetování by měly být používány filtrační špičky odolné vůči aerosolu, aby se zabránilo křížové kontaminaci mezi vzorky. Ze stejného důvodu používejte jednorázové vyšetřovací rukavice a často je měňte.

Místnost 1 - uchovávání a příprava činidel

Tato místnost a její zařízení musí být udržovány **bez DNA (a amplimerů)**. Tato místnost se používá pouze pro přípravu činidel PCR. Kontrola PCR by neměla být přinášena do místnosti 1. Personál, kterého se týká vstup do této místnosti, by měl nosit čistý laboratorní plášť, který nesmí mít na sobě mimo tuto místnost. Když se manipuluje s činidly, musí se používat jednorázové rukavice.

Místnost 2 - příprava vzorků

Tato místnost a její zařízení musí být udržovány **bez amplimerů**. Personál, kterého se týká vstup do této místnosti pro přípravu vzorků, by měl nosit čistý laboratorní plášť, který nesmí mít na sobě mimo tuto místnost. Při přípravě vzorků se musí používat jednorázové vyšetřovací rukavice, které se musí často měnit. Opatrně odzátkejte skleničku obsahující (zpracováváný) vzorek. Zamezte, aby ve stejnou dobu, byla otevřena více než jedna reakční sklenička obsahující vzorek.

Zamezte kontaminaci nebo čištění kontaminovaných povrchů. Doporučuje se čistit pipety a pracovní povrchy přípravkem DNAZap™ (Ambion). Uvědomte si, že používání DNAZap™ je pouze další bezpečnostní opatření a popsaná doporučení na laboratorní úpravy a provádění postupů by měla být prováděna co nejpřesněji.

Místnost 3 - amplifikace a detekce amplimeru

Personál, kterého se týká amplifikace a detekce amplimerů, by měl nosit čistý, denně vyměňovaný laboratorní plášť, který nesmí mít na sobě mimo tuto místnost. Pokud pracuje s amplimery, měl by používat jednorázové vyšetřovací rukavice.

Parametry testu

Inkluzivita

SPF10 fragmenty všech 32 HPV genotypů přítomných na stripu byly klonovány do plazmidů a testovány soupravou INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* II. Všechny genotypy HPV byly specificky detekovány jejich příslušnými próbami.

Shoda s INNO-LiPA HPV Genotyping Extra

Shoda mezi INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* II a INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* byla hodnocena pomocí celkem 150 suspenzí cervikálních buněk pozitivních na HPV DNA s vysokým rizikem HPV uchovávaných buď v konzervačním roztoku SurePath (BD-Tripath) nebo ThinPrep PreservCyt. Testy byly prováděny pomocí Auto-LiPA 48 a vizuální interpretace. Všechny vzorky měly platné výsledky (150/150; 100%, jednostranný 95% CI 98,2%).

Shoda byla definována jako procento platných a interpretovatelných výsledků LiPA s použitím vzorků HC2 + ve shodě s referenční metodou INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*, pro běžné (HC2, LiPA *Extra* a LiPA *Extra* II) vysoce rizikové

genotypy (= HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68). Souhlasný výsledek byl tedy definován jako ten, který měl alespoň jeden z těchto vysoce rizikových genotypů ve shodě mezi novým testem a referenční metodou.

Ze všech testovaných 150 vzorků mělo 135 výsledek, který byl stejný jako referenční metoda (135/150; 90 %, resp. 95 % CI 85.2 %).

15 vzorků mělo odlišný výsledek.

- Ve 12 těchto vzorcích bylo detekováno 12 vysoce rizikových genotypů pomocí nového stanovení, které nebyly detekovány referenční metodou (vzorky byly určeny jako vysoce rizikové, pozitivní na HC2). V 7 z těchto vzorků byly zjištěny HPV59 nebo 68. Tyto odlišné výsledky byly očekávány, vzhledem ke zvýšené senzitivitě, kvůli níž byly tyto stripy vyvíjeny.
- Dva další vzorky byly smíšené infekce, kde byl nalezen pravděpodobně rizikový genotyp (HPV70 v jednom případě HPV53 a HPV82 ve druhém), které byly detekovány jak novou, tak referenční metodou.
- Jeden zbývajících vzorek vykazoval HPV68 v novém testu a HPV51 v referenční metodě.

LiRAS pro LiPA HPV software

Všech 150 vyvinutých stripů z prováděné studie bylo interpretováno jak vizuálně, tak pomocí softwaru LiRAS for LiPA HPV v3.00. Z těchto vzorků 143 vykazovalo souhlasný výsledek genotypu (95.3 %, resp. 95 % CI 91.6 %). Rozdílné genotypy ve zbývajících 7 vzorcích. Všechny měly hodnoty optické denzity velice blízko naprogramované cut-off, s jednou výjimkou na průběh pro HPV31 s OD 0,0305. Všech 7 vzorků byla směsná infekce, kde alespoň jeden byl vysoce rizikový genotyp detekovaný jak vizuálně, tak pomocí softwaru.

Přesnost

Byl testován panel 8 pozitivních HPV vzorků (5 jednotlivých infekcí, 3 vícenásobné) v různých dnech, 3 různými šaržemi, 3 techniky za použití různých přístrojů (Auto-LiPA 48 a PCR cykler). Ve všech opakováních byla naprostá shoda výsledků. Výjimkou byl jeden vzorek, kdy se objevil navíc HPV 16 v jednom opakování. Přesnost tudíž je 111/112 (99,1 % respektive 95% CI 96,1)

Shoda mezi suspenzí cervikálních buněk a vzorky prvního proudu moči.

Pomocí soupravy INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II byla zjišťována shoda mezi vzorky první dávky moči konzervovanými UCM (FVU) a suspenzí buněk děložního čípku stanovených. Bylo použito 77 spárovaných vzorků suspenze cervikálních buněk a první dávky moči odebrané pomocí zařízení Colli-Pee pro vzorky vysoce rizikových nebo potenciálně vysoce rizikových skupin. Vzorky moči byly odebrány ve stejné době jako vzorky cervikální od žen doporučených na kolposkopii. Testy byly provedeny pomocí Auto-LiPA 48 a interpretovány pomocí softwaru LiRAS pro LiPA HPVv3.01.

Shoda byla stanovena jako procento shodných výsledků z hlediska genotypů (potenciálního) vysokého rizika na celkový počet vzorků. Shodný výsledek byl

definován jako přítomnost alespoň jednoho z vysoce rizikových nebo potenciálně vysoce rizikových genotypů HPV v obou maticích.

Ze 77 testovaných vzorků mělo 72 výsledek, který byl v souladu s referenční metodou (72/77; 94%; jednostranný 95% CI 87%).

Tkáň fixovaná ve formalínu a zalitá v parafínu (FFPE)

Literatura ukazuje, že INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II se často používá jako referenční test a má přijatelnou shodu u vzorků FFPE s jinými komerčně dostupnými HPV-genotypizačními testy^{1,2}. INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II lze použít v rutinních laboratořích pro testování vzorků FFPE.

Analytická citlivost

Mez detekce byla stanovena pro genotypy HPV 16, 18, 31, 33 a 45, reprezentující pět z nejvíce převládajících vysoce rizikových genotypů. Plazmidová DNA, s přítomností humánní DNA, byla naředěna (1/3) v rozsahu od 5000 kopií/PCR reakci do 0 kopií/PCR reakci. Každé ředění bylo testováno 8-krát.

Nebylo možné definovat mez detekce jako 95 % pravá hodnota (bod odhadu) pro HPV16, HPV 18 a HPV31. z důvodu formátu získaných dat.

V analýze citlivosti, kdy bylo zjišťováno od bodu negativity ke kompletní pozitivitě zaznamenané poprvé (8/8 nahradilo 7/8) a bylo možné zkalkulovat rozložení pravděpodobnosti „probit value“ Velice nízká LoD byla získaná pro HPV16 a HPV (horní mez 95 % CI byl 6 kopií/PCR) a vyšší LoD pro HPV31,33 a 45 (horní mez 95 %CI byl od 42 kopií/PCR po 437 kopií/PCR).

Obchodní značky

- INNO-LiPA, je obchodní značka Fujirebio Europe N.V, registrovaná v US a jiných zemích.
- LiRAS je obchodní značka Fujirebio Europe N.V (dříve známé jako Innogenetics N.V v EU)
- Colli-Pee je obchodní značka firmy Novosanis

Odkazy - Reference

1. Donà MG, et al. Oral Oncology. 2017; 72:117-122
2. Veyer D., et al. Pathology. 2019; 51(4):421-425