

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*



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



eifu.fujirebio.com/FRE/all/?keycode=FRI81954

☎ +800 135 79 135 / +31 20 794 7071

8:00 – 17:00 GMT+1

M	T	W	T	F	S	S
☒	☒	☒	☒	☒	☐	☐

OBSAH

Použité symboly	2
Použití	3
Princip testu	3
Reagencie	4
Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	6
Varování a upozornění	7
Vzorky	9
Postup přípravy a manipulace	9
Manuální pracovní postup	11
Automatizovaný pracovní postup	12
Výsledky	13
Interpretační software: LiRAS for LiPA HPV	15
Omezení pracovního postupu	15
Doporučení organizace laboratoře	16
Parametry testu	17
Obchodní značky	19
Odkazy	19

Použité symboly

Výrobce



In vitro diagnostický zdravotnický prostředek



Číslo šarže



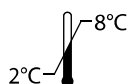
Katalogové číslo



Použitelné do



Podle návodu k použití



Teplotní omezení



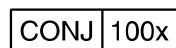
Obsah stačí pro <n> testů



Line Probe Assay

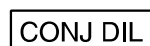


Stripy



Conjugate 100x

Konjugát



Conjugate diluent

Ředění konjugátu



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

Použití

INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II je line-probe test pro in vitro diagnostické použití, určený pro kvalitativní detekci a identifikaci genotypů lidského papilomaviru (HPV) detekcí specifických sekvencí v oblasti L1 genomu HPV, extrahované z cervikálních buněk odebraných v kapalném médiu (SurePath, Thinprep PreservCyt), z prvního proudu moči nebo tkáni zalité ve formalínu fixovaném v parafínu (FFPE).

Je to pomůcka při diagnostice infekce HPV a dokáže detekovat, identifikovat a rozlišovat mezi typy HPV s nízkým rizikem (LR) a typy HPV s vysokým rizikem (HR), které se ukázaly být primárním kauzálním faktorem rozvoje rakoviny děložního čípku a také spojené s rakovinou konečníku, vaginy, penisu, vulvy a orofaryngu. Výsledky testu by měly být použity ve spojení s dalšími klinickými informacemi. Test není určen k použití pro screening. Test lze provést manuálně nebo automatizovaně (viz část „Automatické testovací postupy“).

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.

Uživatel:

Laboratorní technici nebo výzkumní pracovníci v klinických nebo výzkumných laboratořích s odpovídajícími laboratorními dovednostmi a dobře vyškolení v metodách PCR a reverzní hybridizace.

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 prouzcích. 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 soupravu (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 Vizuální 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 zvlíní, doporučuje se skladování tuby ve vodorovné poloze.

Dodávané reagencie:

Složka	Množství	Kat.č.	Popis
Stripy	1 x 20	60584	Obsahuje 20 proužků INNO-LiPA HPV Genotyping <i>Extra II</i> označených modrou značkou.

Složka	Množství	Kat.č.	Popis
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 přehřát 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 přehřát na teplotu nejméně 37 °C, která však nesmí být vyšší než 49 °C
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.

Složka	Množství	Kat.č.	Popis
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).
Inkubační žlábký.	3	-	Inkubační žlábký
Odečítací karty	1	-	Karta pro identifikaci pozitivních linií.
Dokumentační list	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 rozliti kapaliny.
- Doporučená rychlost je 50 otáček za minutu.
- Jednorázová multipipeta (Eppendorf, volitelná).
- Stopky, 2 hodinové (± 1 minuta).

- Ochranné brýle

Varování a upozornění

Zdraví, 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.com



Danger DENAT SOLN

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



Warning RINSE SOLN 5x

Obsahuje 2-chloracetamid
Varování H317 P261 P280 P333+P313 P362+P364 P302+P352



Danger SUBS BCIP/NBT 100x

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

SUBS BUF CONJ DIL CONJ 100x STRIN WASH SOLN HYBRIDIZ SOLN EUH208
EUH210

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

EUH208

Obsahuje 2-chloracetamid. Může způsobit alergickou reakci

EUH210

Bezpečnostní list dostupný na vyžádání

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 (potenciálně) infekční 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 kapalnou odpad, který obsahuje kyselinu.
- Je nutné používat osobní ochranné prostředky: laboratorní plášť, rukavice a bezpečnostní pomůcky. brýle při manipulaci s nebezpečnými nebo infekčními látkami.
 - V případě potřeby přijměte bezpečnostní opatření týkající se látek CMR v souladu s platnými předpisy o ochraně zdraví při práci zaměstnanců obecně a zejména mladých zaměstnanců nebo těhotných a kojících zaměstnankyň.
 - Zlikvidujte všechna použitá nebo zbytková činidla a další kontaminované materiály k likvidaci v souladu se směrnicemi instituce pro likvidaci odpadu. Každá laboratoř je odpovědná za nakládání s pevnými a kapalnými odpady podle jejich povahy a stupně nebezpečnosti a za jejich zpracování a likvidaci v souladu se všemi platnými (mezi)národními a místními předpisy.

Shrnutí bezpečnosti a výkonnosti (SSP)

- Souhrn bezpečnosti a výkonnosti naleznete na následujícím místě (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>) po spuštění Evropské databáze zdravotnických prostředků (EUDAMED).

- V případě, že došlo k závažnému incidentu, kontaktujte prosím společnost Fujirebio Europe N.V. a regulační orgán příslušné země do 24 hodin.

Analytická bezpečnostní opatření

- Nemíchejte reagenty z různých souprav, pokud komponenty nemají shodná čísla šarží.
- Nepoužívejte opakovaně jednorázový laboratorní materiál.
- Všechny nádoby používané k přípravě roztoků konjugátů a substrátů je třeba důkladně vyčistit a vypláchnout destilovanou vodou.
- Zabraňte mikrobiální kontaminaci činidel.
- Pro každý alikvotovaný vzorek použijte novou pipetovací špičku bez DNA/DNázy. Doporučují se sterilně balené jednorázové pipetové špičky odolné vůči aerosolům. Abyste zabránili kontaminaci PCR, maximalizujte fyzické oddělení kroků před a po amplifikaci. Nevracejte vzorky, vybavení ani činidla do oblasti kde jste prováděli předchozí krok. Pokud se potřebujete vrátit k předchozí práci oblasti, proveďte nejprve příslušné dekontaminační kroky.

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. (Molijn, a kol.2005).
2. První proud moči s konzervantem Vorsters, a kol. 2014, Pattyn, a kol. 2019)
3. Vzorek tkáně fixovaný formalínem a zalitý v parafínu (FFPE) (Doña, a kol.. 2017 ; Veyer, a kol 2019).

Postupy přípravy a manipulace

Manipulace se stripem

- Stripy jsou určeny pro jedno použití
- Nedotýkejte se stripů 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 žládku během celé doby různých inkubačních kroků.
- Nepoužité nebo už vyvinuté stripy by neměly být na intenzivním světle a teple.
- Vyvinuté stripy se před interpretací, uložením a skladováním nechají zcela usušit.
- Vyvinuté suché proužky by měly být uchovávány převážně v temnu při pokojové teplotě (20–25 °C).
- Nepoužívejte žládky opakovaně.

Pokyny pro manuální pracovní postup - inkubace

- Inkubace při 49 °C +/- 1 °C během hybridizace a při důsledném promývání jsou nejkritičtější kroky pro 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 důsledná kontrola přesné teploty kalibrovaným teploměrem (do 1 °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.**
- 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 až 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.
- 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 rozstříkovaní kapaliny přes okraje žlábků. To by mohlo vést ke zkřížené kontaminaci a chybným výsledkům..
- Během hybridizace a inkubace promýváním mohou být žlábků ve vodní lázni nezakryté. Jejich zakrytí může způsobit křížovou kontaminaci.

Pokyny pro manuální výměnu kapaliny ve žlábcích - odsátí a doplnění kapaliny ve žlábcích

- 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.
- Užitečná je dávkovací multipipeta Multipipette® (Eppendorf).
- Tento krok opakujte tolikrát, kolikrát je uvedeno v protokolu testu.

POZNÁMKA:

- Nepřipusťte, aby mezi kroky promývání 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.

LiPA Manuální postup testu

Před inkubací zkontrolujte teplotu ($49\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) vodní lázně kalibrovaným teploměrem a v případě potřeby upravte teplotu před umístěním vaničky do vodní lázně. Vždy zavřete víko.

Vzorky

Ujistěte se, že je přidáno přesně 10 μl amplifikovaného vzorku. Příliš mnoho nebo příliš málo vzorku může vést k nesprávnému výsledku typizace.

Denaturace a hybridizace

POZNÁMKA: Noste jednorázové rukavice a používejte chemické kleště.

1. Vodní lázeň třepačky zahřejte na $49\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Teplotu zkontrolujte kalibrovaným teploměrem, a pokud je to nutné, vyregulujte. Hybridization solution (hybridizační roztok) a Stringent Wash solution (promývací roztok) se předehejí na nejméně 37 °C , ale teplota nesmí přesáhnout 49 °C . Před použitím promíchejte. Všechny krystalky by měly být rozpuštěny.
2. Kleštěmi vyjměte z tuby požadovaný počet testovacích proužků (1 proužek na vzorek) a nad horní značku proužku tužkou napište identifikační číslo.
3. Vezměte požadovaný počet testovacích žlábků (1 žlábek na 1 proužek) a vložte je do rámečku.
4. Pipetujte 10 μl denaturačního roztoku (Denaturation Solution) do horního rohu každého žlábků.
POZNÁMKA: Ihned po použití lahvičku uzavřete.
5. 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 denuraci probíhat po dobu 5 minut při teplotě 20 až 25 °C .
6. **Protřepete předeheřtý hybridizační roztok a opatrně přidejte do každého žlábků 2 ml k denaturovanému amplifikovanému produktu.** Dejte pozor, abyste během pipetování nekontaminovali sousední žlábků.
7. Ihned vložte proužek do žlábků označenou stranou nahoře. Proužky by měly být zcela ponořeny do roztoku.
8. Umístěte žlábků v rámečku do vodní lázně třepačky vytemperované na $49\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (80 rpm (ot. za min); viz "[Pokyny pro manuální postup - inkubace](#)"), 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. Aby se zamezilo klouzání rámečku se žlábků, imobilizujte rámeček mezi těžká závaží.

Důkladné promývání

9. Po hybridizaci vyjměte rámeček se žlábků z vodní lázně.
10. Držte vaničku pod nízkým úhlem, aby se tekutina hromadila na jednom konci vaničky nad značkovací čarou na proužcích a bylo možné ji snadno vyjmout.

Nepoškozujte povrch proužků. Zabraňte rozstříkávání nebo přenášení roztoků mezi žlábků. Odsajte kapalinu ze žlábků pipetou, nejlépe připojenou k vakuovému odsávači. Do každého žlábků přidejte 2 ml přehřátého přísného promývacího roztoku a propláchněte krátkým pohupováním vaničky (10 až 20 sekund) při teplotě 20 °C až 25 °C. Roztok z každého žlábků odsajte. Tento promývací krok jednou zopakujte (viz "[Pokyny pro manuální testovací postup - odsávání a dávkování kapaliny do žlábků](#)").

11. Nakonec aspirujte roztok a inkubujte každý proužek ve 2 ml přehřátého přísného roztoku. promývacím roztoku v třepací vodní lázni při teplotě 49 °C ± 1 °C po dobu 30 minut. Uzavřete víko vodní lázně.

POZNÁMKA: Připravte si pracovní roztok pro výplach a pracovní roztok pro konjugát předtím, než přísnou promývací inkubací. Viz "[Reagencie](#)".

Vývoj barvy

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

Během inkubace se kapalina a testovací stripy pohybují ve žlábků tam a zpět pro homogenní vybarvení.

12. Každý strip se promývá dvakrát po dobu 1 minuty 2 ml zředěného promývacího roztoku (Rinse Solution) (viz „[Reagencie](#)“ a "[Pokyny pro výměnu kapaliny ve žlábků](#)"). Odsaje se.
13. Do každého žlábků se přidají 2 ml roztoku konjugátu (Conjugate solution) (viz. [Reagencie](#)) 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](#)").
14. Každý proužek se promývá dvakrát po dobu 1 minuty 2 ml naředěného promývacího roztoku a jednou se promyje 2 ml substrátového pufru. Odsaje se.
15. Do každého žlábků se přidají 2 ml roztoku substrátu (Substate solution) (viz "[Reagencie](#)"). a inkubuje se 30 minut s protřepáváním. Odsaje se.
16. Promýváním proužků se zastaví vývoj barvy: dvakrát 2 ml destilované vody, zatímco se protřepává po dobu nejméně 3 minut.
17. 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

Pro automatizované zpracování proužků INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II lze použít následující přístroje: TENDIGO, Auto-LiPA 48, Auto-LiPA 30 a Autoblots 3000H.

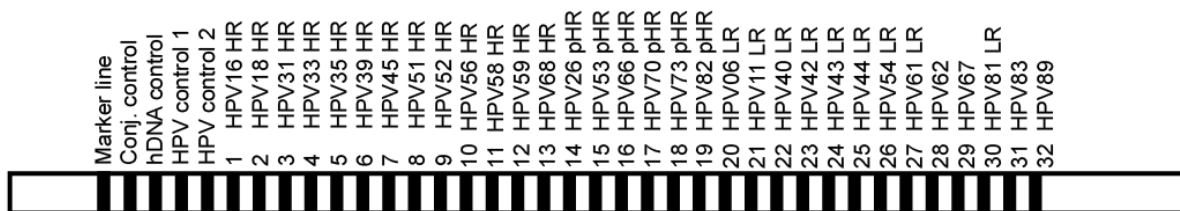
Ohledně instalačních postupů nebo návodu k přístroji se obraťte na společnost Fujirebio Europe N.V. (viz <https://www.fujirebio.com/en/resource-center/automated-test-procedures>). Lze použít i jiná automatizační řešení, ale před použitím je třeba provést interní validaci postupu..

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.

Validace

- Vždy zahrňte pozitivní kontrolu běhu: např. pozitivní kontrolu amplifikace, která je součástí balení. v sadě INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp. Pozitivní kontrola obsahuje HPV6 a HLA-DPB1 a měla by reagovat na následujících liniích: V případě, že se jedná o kontrolu Conj, hDNA kontrola, kontrola HPV 1 a linie 20 (HPV6). Pokud je negativní nebo se odlišuje oproti vzorci LiPA pro pozitivní kontrolu, měla by být celá série vyřazena a postup by se měl opakovat od PCR.
- Vždy zahrňte negativní kontrolu běhu: nejlépe by to měl být negativní vzorek. který je zpracováván současně se vzorky pacientů při extrakci DNA a následné analýze. PCR. Pokud se u negativní kontroly získá pozitivní linie na LiPA, (s výjimkou hDNA kontroly, která musí být pozitivní i v případě HPV negativního klinického testu), měla by být celá série vyřazena a celý postup by se měl opakovat od fáze extrakce DNA.
- První linie je linie markeru. Druhá linie je linie kontroly konjugátu. Tato linie kontroluje přidání reaktivního konjugátu a roztoku substrátu během detekčního postupu. Měla by být vždy pozitivní a měla by mít přibližně stejnou intenzitu na každém proužku ve daném testovacím cyklu. Negativní výsledek na kontrolní linii konjugátu znamená chybu ve vývoji barvy testu. Výsledek testu by měl být považován za neplatný a se test LiPA je třeba opakovat.
- Třetí řádek je kontrolní řádek lidské DNA. Primery amplifikující fragment HLA-DPB1 jsou přidány do soupravy pro amplifikaci HPV za účelem kontroly vzorku. kvality a účinnosti extrakce. Tato linie by měla být vždy pozitivní, avšak pokud je ve vzorku přítomno vysoké množství HPV, je možné, že se lidská DNA je kontrolní linie negativní z důvodu konkurence mezi HPV a lidskou DNA.
- Čtvrtá a pátá linie jsou kontrolní linie HPV, které potvrzují a detekovat přítomnost. typů alfa-HPV. Jedná se o takzvané slizniční typy, které jsou spojeny s cervikální rakovinou.

Interpretace výsledků

- vzorek je považován za HPV pozitivní, pokud je alespoň jedna z typově specifických linií pozitivní, nebo pokud je pozitivní jedna z HPV kontrolních linií.
- Vzorky, které negenerují žádné pozitivní typově specifické linie (řádky 1–32), ale mají pozitivní alespoň jednu HPV kontrolní linii, musí být hodnoceny jako HPV pozitivní, ale jsou netypovatelné („HPVX“).
- Pokud je pozitivní více než jedna linie genotypu HPV, je přítomna směs těchto genotypů HPV.
- Vzorek je považován za HPV negativní, pokud je kontrolní linie hDNA pozitivní a všechny linie specifické pro typ HPV (včetně kontrolních linií HPV) jsou negativní.
- Pokud žádná z linií specifických pro typ HPV není pozitivní a kontrolní linie hDNA je negativní, výsledek testu by měl být považován za neplatný. Tento výsledek testu může ukazovat na nekvalitní odběr, zpracování nebo přítomnost inhibitorů v extraktu DNA. V druhém případě může testování ředění DNA extraktu v poměru 1:10 zlepšit výkon amplifikace. Pokud není úspěšný, začněte celý postup z nového alikvotu vzorku.
- Pozitivní signál na alespoň 7 z 12 po sobě jdoucích řádků na proužku by měl být interpretován jako pravděpodobně neplatný výsledek. U tohoto vzorku se doporučuje opakovat celý postup počínaje extrakcí DNA.
- Pokud by k tomu došlo podruhé, mohlo by se jednat o skutečný výsledek genotypizace pro určité populace, jako jsou imunokompromitovaní jedinci s více infekcemi*.
- (* Jak popsal Wheeler, et al. Genotypy lidského papilomaviru a kumulativní 2leté riziko prekancerózy děložního čípku. J Infect Dis, 2006;194(9):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 pracovního 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 proub.

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 odzátkujte skleničku obsahující (zpracovávaný) 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 výsledků, 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 zbývající 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 próbě pro HPV83s OD 0,0305. Všechny 7 vzorků byla smíšená 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)
- DNAZap je obchodní značka firmy Ambion Inc., USA.
- PreservCyt je registrovaná obchodní značka firmy Hologic Inc., USA.
- SurePath je obchodní značka firmy BD Diagnostics, USA.
- Colli-Pee je obchodní značka firmy Novosanis

Odkazy - Reference

1. Muñoz, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003;348(6):518-527.
2. IARC Monographs Volume on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100B (2012).
3. Molijn A, *et al.* Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*, 2005;32S:S43-S51.
4. Safaeian M, *et al.* Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5683 young women in Guanacaste, Costa Rica. *J Clin Microbiol*, 2007;45(5):1447-1454.
Vorsters A, *et al.* Optimization of HPV DNA detection in urine by improving collection, storage and extraction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014.33(11):2005-2014.
5. Pattyn J, *et al.* Human papillomavirus detection in urine: Effect of first-void urine collection device and timing of collection. *J Virol Meth*, 2019;264:23-30.
6. Donà MG, *et al.* Evaluation of the Xpert® HPV assay in the detection of Human Papillomavirus in formalin-fixed paraffin-embedded oropharyngeal carcinomas. *Oral Oncol*, 2017;72:117-122.
7. Veyer D, *et al.* HPV detection and genotyping of head and neck cancer biopsies by molecular testing with regard to the new oropharyngeal squamous cell carcinoma classification based on HPV status. *Pathology*, 2019;51(4):421-425.
8. Wheeler, *et al.* Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis*, 2006;194(9):1291–1299.