

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II Amp*



Vyrobeno: _____

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

Distribuce:

ASCO-MED spol. s r.o.
Pod Cihelnou 664/6
16100 Praha 6
Tel. +420 233 313 578
e-mail: asco@ascomed.cz



eifu.fujirebio.com/FRE/all/?keycode=FRI55220

☎ +800 135 79 135/ +31 20 784 7071

8:00 - 17:00 GMT+1

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| M | T | W | T | F | S | S |
| ☒ | ☒ | ☒ | ☒ | ☒ | ☐ | ☐ |

OBSAH

| | |
|--|----|
| Použité symboly | 2 |
| Použití | 2 |
| Princip testu | 3 |
| Reagencie | 3 |
| Materiál potřebný, ale nedodávaný | 4 |
| Poznámky a upozornění | 4 |
| Bezpečnost a životní prostředí | 4 |
| Odběr vzorku a extrakce DNA | 5 |
| Pracovní postup | 10 |
| Výsledky | 11 |
| Omezení postupu | 11 |
| Provádění testu | 11 |
| Doporučení pro organizaci laboratoře a postupů | 11 |
| Obchodní značky | 12 |
| Odkazy | 12 |

Použité symboly

Výrobce

*In vitro* diagnostický zdravotnický prostředek

šarže



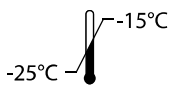
Katalogové číslo



Použitelné do



Viz návod k použití



Teplotní omezení



Amplifikační souprava



Master Mix

Použití

Souprava INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* Amp kit pro diagnostické použití *in vitro* je určena k amplifikaci části oblasti L1 lidského papilomaviru (HPV) extrahované z lidských cervikálních buněk odebraných do tekutého media (SurePath, Thinprep PreservCyt), z prvního proudu moči, nebo z tkáně fixované formalinem a zalité parafinem (FFPE) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tento amplifikovaný produkt lze použít pro INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* II.

Princip testu

Amplifikace širokého spektra genotypů HPV nutně vyžaduje použití společných primerů cílených do oblastí v genomu HPV konzervovaných mezi různými genotypy. Nejchráněnější oblastí genomu HPV je oblast L1, a v této oblasti byly popsány některé společné skupiny PCR primerů, (Molijn a kol. 2005).

Skupina primerů SPF10 používaná v INNO-LiPA HPV Genotyping Extra amplifikuje oblast 65-bp v L1 v otevřeném čtecím rámci (Kleter a další, 1998) a má potenciál amplifikovat nejméně 54 typů HPV (Safaeian a kol. 2007). Tato sada primerů je upgradovanou verzí soupravy primerů "SPF10".

PCR amplifikace probíhá ve směsi činidel obsahující přebytek deoxynukleových 5'-trifosfatů (dNTPs), včetně deoxyuridin-trifosfátu, biotinovaných primerů, termostabilní polymerázy DNA a uracil-N-glykosylázy (UNG). Inkubace před amplifikací odstraní uracilové báze z jakýchkoliv znečištěných amplifikačních produktů přítomných v reakční směsi. Enzym UNG se inaktivuje, když se teplota zvýší během následující denaturace na 94 °C. Směs vzorku se zahřeje, aby se oddělily obě vlákna šroubovice DNA (denaturace) a cílové sekvence se vystaví vlivu primerů. Tyto primery jsou komplementární k cílové oblasti. Tak jsou po jednom cyklu denaturace, ochlazení a prodloužení vytvořeny dvě přesné biotinylované kopie templátu. Po 40 cyklech se získá multi-amplifikovaná biotinylovaná cílová sekvence.

Reagencie

Popis, příprava pro použití a doporučené podmínky skladování

- Skladovány při -20 °C, otevřené nebo neotevřené v původních skleničkách, jsou činidla stabilní do data expirace soupravy. (Jsou povoleny nejvýše 4 cykly rozmrazování / zmrazování). Nepoužívejte činidla po jejich datu expirace.
- Činidla by měla být skladována izolovaně mimo jakýkoliv zdroj kontaminující DNA, zvláště mimo amplifikované produkty.
- Aby se zabránilo kontaminaci, skladuje se pozitivní kontrola odděleně od amplifikačních činidel a amplifikovaného materiálu.
- Rozmrazte předpřipravený Master Mix ponecháním v pokojové teplotě. Po rozmrznutí umístěte do chladicího bloku nebo na led. Před použitím centrifugujte.
- Změny fyzikálního vzhledu činidel soupravy mohou indikovat jejich nestabilitu nebo rozklad.

Dodávaná činidla:

| <u>Složka</u> | <u>Množství</u> | <u>Ref.</u> | <u>Popis</u> |
|----------------------|------------------------|--------------------|--|
| Master Mix | 1 x 1 ml | 60587 | Obsahuje směs biotinylované primery v pufru s dNTP/dUTP mix, MgCl ₂ . Obsahuje AmpliTaq Gold® 360 DNA polymerázu, uracyl-N-glykosylázu a 0,05 % NaN ₃ jako konzervant. |
| CONTROL + | 1 x 0,05 ml | 59732 | PCR kontrola obsahuje HPV6 DNA a HLA-DPB1 DNA a 0,05 % NaN ₃ jako konzervant. |

Materiál, který je potřebný a není dodávaný

- QIAamp MinElute Media Kit, (QIAGEN) kat.č. 57414 nebo QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)kat.č. 51304) nebo QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN) kat.č. 60404.
- Destilovaná/deionizovaná voda bez DNA/DNasy (pro PCR)Jednorázové rukavice
- Jednorázové špičky do pipet bez DNA/ DNasy, odolné vůči aerosolu.
- Pipety nastavitelné na objem 1–20 µl, 20–200 µl a 200–1000 µl.
- Mikrozkušavky bez DNA/ DNasy
- DNAZap™ (Ambion, Kat. č. 9890)
- Stojánek pro mikrozkušavky
- Centrifuga pro mikrozkušavky
- Vortex nebo ekvivalent
- Vyhřívací blok
- DNA termocykler a vybavení
- Minerální olej, silikonový tuk (je-li potřeba)
- Ethanol (96–100 %)

Varování a upozornění**Zdraví, bezpečnost a životní prostředí**

Informace o potenciálních nebezpečných složkách jsou uvedeny v bezpečnostních listech (SDS) a na štítku výrobku. Nejnovější verze je dostupná na webové stránce: www.fujirebio.com.

- Provádění testu by mělo být povoleno pouze odborně školenému personálu.
- Je nezbytné používat osobní ochranné prostředky: při manipulaci s nebezpečnými nebo infekčními činidly, noste rukavice a ochranné brýle.
- Se vzorky by se mělo vždy manipulovat jako s potenciálně infekčním materiálem. Proto všechny složky krve a biologický materiál by také měly být pokládány za infekční a podle toho by se s nimi mělo nakládat.
S každým (potenciálně)infekčním odpadem by mělo být nakládáno podle ustanovení směrnic o likvidaci odpadu. Měla by být také dodržována všechna federální, státní a místní nařízení o ochraně životního prostředí.
- Autoklávat po dobu nejméně 15 minut při 121 °C.
- Jednorázový materiál spálit.
- Smíchat tekutý odpad s chlornanem sodným tak, aby konečná koncentrace činila ± 1 % chlornanu sodného. Před likvidací nechte přes noc odstát.

UPOZORNĚNÍ: Před přidáním chlornanu neutralizujte kapalný odpad, který obsahuje kyseliny.

- Všechna použitá nebo zbytková činidla a další kontaminované materiály k likvidaci zlikvidujte v souladu s pokyny pro likvidaci odpadu dané instituce. Každá laboratoř je odpovědná za nakládání s pevným a kapalným odpadem podle jeho povahy a stupně nebezpečnosti a za jeho zpracování a likvidaci v souladu s 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 o zdravotnických prostředcích (EUDAMED).
- Obraťte se na společnost Fujirebio Europe N.V. a regulační orgán příslušného státu. země do 24 hodin v případě, že došlo k závažnému incidentu.

Analytická bezpečnostní opatření

- Všechny pipetovací špičky a zkumavky používané pro amplifikační proces by měly být autoklávovány.
- Doporučuje se používat pipetovací špičky odolné vůči aerosolům.
- Pro každou alikvotní část vzorku použijte novou pipetovací špičku bez DNA/DNázy.
- Abyste zabránili kontaminaci PCR, maximalizujte fyzickou separaci pre- a po amplifikaci. Proto se doporučuje: oddělené místnosti, oddělené pipety a další laboratorní materiál, oddělené laboratorní pláště a rukavice (a jejich zásoby) jsou minimálními opatřeními pro prevenci kontaminace a součástí správné laboratorní praxe. Reagencie by měly být izolovány od jakéhokoli zdroje kontaminující DNA, zejména amplifikovaných produktů DNA. Zabraňte také mikrobiální kontaminaci činidel.
- Zabraňte jakémukoli vracení materiálů z místnosti po amplifikaci do místnosti před amplifikací a do místnosti, kde se provádí amplifikace.
- S činidly pro amplifikační procesy by se mělo manipulovat v místnosti bez DNA.
- Po rozmrazení protřepejte Master Mix třikrát převrácením lahvičky, vortexujte pozitivní kontrolu a všechna činidla stočte.

Odběr vzorků a extrakce DNA

Odběr vzorku, převoz a následná extrakce DNA není součástí soupravy INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra Amp* kit.

Souprava INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra Amp* Kit byla validována za použití:

1. Cervikálních buněk odebraných do média SurePath nebo PreservCyt medium, následovaný izolací pomocí QIAamp MinElute Media Kit (QIAGEN), jehož adaptovaný postup je popsán níže. Mohou být použity další standardní protokoly pro odběr cervikálních buněk do odběrového média (např. roztoky obsahující alkohol) kombinované s extrakcí HPV

DNA za použití jiných komerčně dostupných souprav, ale je potřeba in-house validace (Molijn a kol. 2005).

Stěry buněk děložního čípku odebrané v médiu Surepath nebo PreservCyt jsou stabilní do 10 týdnů při pokojové teplotě (Gilbert a kol. 2013).

2. Prvního proudu moči konzervovaného UCM odebraného pomocí soupravy Colli-Pee s následnou extrakcí soupravou QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN adaptovaným pracovním postupem, popsáným dále. Každé další postupy pro odběr vzorků první moči akombinované s protokolem HPV DNA extrakce a použití jiných komerčních souprav je třeba validovat (Vorsters a kol. 2014, Pattyn a kol. 2019).

Doporučené podmínky pro skladování první moči odebrané pomocí UCM jsou:

- Krátkodobé skladování při pokojové teplotě: 7 dní
- Krátkodobé až střednědobé skladování při 4 °C: 14 dní
- Střednědobé skladování při -20 °C: 7 až 90 dní
- Dlouhodobé skladování při teplotě -80 °C: Alikvoty do kryo-lahviček po dobu až 12 měsíců (Meers a kol. 2021).

3. Vzorek tkáně fixované v formalínu a zalité v parafínu (FFPE) Doporučuje se izolace DNA pomocí standardního protokolu (FFPE). Doporučuje se standardní protokol QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN). Další standardní protokoly pro extrakci HPV DNA pomocí jiných komerčně dostupných souprav vyžadují interní ověření (Dona a kol. 2017, Veyer a kol. 2019).

HPV lze detekovat v archivovaných tkáních FFPE, a to i uchovávaných po desítky let. Upozornujeme, že v souvislosti se stářím vzorku může dojít k možné degradaci DNA. (Kokkat a kol. 2013, Park a kol. 2018, Nicolás-Párraga a kol. 2021).

POZNÁMKA: Reagencie pro extrakci DNA nejsou dodávány.

(1) Cervikální buňky

Příprava cervikálních buněk

- Buňky se uvolní z kartáčku vortexem nebo prudkým mícháním po dobu 15 sekund.
- 1 ml suspenze cervikálních buněk se přenesse do mikrozkušavky, přičemž je nutno zabránit křížové kontaminaci mezi vzorky.
- Zkušavky se odstředí při ca 13 000 rpm po dobu 15 sekund.
- Supernatant se odsaje s novou čistou, jemnou, jednorázovou pipetkou pro každou reakční lahvičku. Každá lahvička se znovu zazátkuje.
- Přidá se 1 ml destilované vody a krátce se promíchá, aby buňky znovu suspendovaly.

POZNÁMKA: resuspendace buněčného peletu by měla být provedena ve stejném objemu jako byla suspenzace cervikálních buněk.

Protokol QIAamp MinElute Media Kit (QIAGEN) byl modifikován kvůli komfortu uživatelů. V tomto protokolu byla použita $\frac{3}{4}$ objemu použitého ve standardním protokolu QIAamp MinElute Media Kit:

1. Pipetujte 50 μ l Buffer ATL do 2 ml mikrocentrifugačních zkumavek (nedodávány).
2. Přidejte 150 μ l vzorku do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky.
3. Přidejte 15 μ l QIAGEN proteinase K. Uzavřete víčko a promíchejte pulsním vortexováním 10 s.
4. Inkubujte při 56 °C 30 min. Promíchejte vzorky, aby se zajistil vysoký výtěžek nukleové kyseliny. Pro optimální výsledek použijte termomixér při 900 rpm. Při použití vyhřívacího bloku vortexujte vzorek příležitostně během inkubační doby.
5. Krátce centrifugujte 2 ml zkumavky, aby se odstranily kapky uvnitř víčka.
6. Přidejte 150 μ l Buffer AL (obsahující 10 μ g/ml nosiče RNA). Uzavřete víčko a promíchejte pulsním vortexováním 10 s.
Pro zajištění dostatečné lýzy je klíčové, aby byly dobře promíchány vzorek, Buffer ATL, QIAGEN proteinase K, and Buffer AL a vznikl homogenní roztok. Po přidání Buffer AL k Buffer ATL se může utvořit bílý precipitát. ten nijak nebrání postupu a rozpustí se během inkubace v kroku 7.
7. Inkubujte při 70°C 15 min. Protřepejte vzorek, aby se získalo velké množství nukleové kyseliny. Pro optimální výsledek použijte termomixér při 900 rpm. Při použití vyhřívacího bloku, vortexujte vzorek příležitostně během inkubační doby.
8. Krátce centrifugujte 2 ml zkumavky, aby se odstranily kapky uvnitř víčka.
9. Přidejte ke vzorku 200 μ l ethanolu (96–100%). Uzavřete víčko a dobře promíchejte pulsním vortexováním 15 s. Inkubujte lyzát s ethanolom 5 min při pokojové teplotě (15–25°C).
POZN.: Pokud teplota v místnosti přesáhne 25°C, měl by být ethanol před přidáním k lyzátu chlazen na ledu.
10. Krátce centrifugujte 2 ml zkumavky, aby se odstranily kapky uvnitř víčka.
11. Vložte QIAamp MinElute kolonku do čisté 2 ml zkumavky.
12. Opatrně pipetujte všechnu lyzát z kroku 10 do QIAamp MinElute column, uzavřete víčko a centrifugujte 1 min při 8000 rpm. Dejte QIAamp MinElute kolonku do čisté 2 ml zkumavky a zlikvidujte zkumavku s filtrátem.
13. Opatrně otevřete QIAamp MinElute kolonku a přidejte 500 μ l Buffer AW2 do QIAamp MinElute kolonky bez potřísnění okraje. Zavřete víčko a centrifugujte 1 min při 8000 rpm. Zlikvidujte zkumavku s filtrátem.
14. Přidejte 500 μ l ethanolu (96–100%) do QIAamp MinElute kolonky. Zavřete víčko a centrifugujte 1 min při 8000 rpm.
15. Zlikvidujte zkumavku s filtrátem.
16. Dejte QIAamp MinElute kolonku do čisté 2 ml zkumavky a centrifugujte při plné rychlosti (20000 x g, 14000 rpm) 3 min aby byla membrána zcela suchá.
17. Dejte QIAamp MinElute kolonku do čisté 1.5 ml zkumavky (v kitu) a zlikvidujte 2 ml zkumavku s filtrátem. Otevřete víčko QIAamp MinElute kolonky a inkubujte kolonku při pokojové teplotě (15–25°C) 5 min.

POZN: Alternativně, pro rychlejší inkubaci vyhřejte otevřenou QIAamp MinElute kolonku 56 °C 3 min.

18. Přidejte 80 µl Buffer AVE do středu membrány QIAamp MinElute kolonky. Zavřete víčko a inkubujte při pokojové teplotě (15–25°C) 1 min. Centrifugujte při plné rychlosti (20000 x g, 14000 rpm) 1 min. Důležité: Zajistěte aby byl Buffer AVE vytemperován na pokojovou teplotu. Inkubace QIAamp MinElute kolonky s přidáním Buffer AVE 5 min při pokojové teplotě zvyšuje výtěžnost.

Tabulka 1. Objemy Buffer AL a směsi nosiče RNA/Buffer AVE potřebné pro postup QIAamp MinElute Media

| Počet vzorků | Objem . Buffer AL (ml) | Objem I. Carrier RNA/AVE (µl) |
|--------------|------------------------|-------------------------------|
| 1 | 0.2 | 2 |
| 2 | 0.4 | 4 |
| 3 | 0.6 | 6 |
| 4 | 0.8 | 8 |
| 5 | 1 | 10 |
| 6 | 1.2 | 12 |
| 7 | 1.4 | 14 |
| 8 | 1.6 | 16 |
| 9 | 1.8 | 18 |
| 10 | 2 | 20 |
| 11 | 2.2 | 22 |
| 12 | 2.4 | 24 |
| 13 | 2.6 | 26 |
| 14 | 2.8 | 28 |
| 15 | 3 | 30 |
| 16 | 3.2 | 32 |
| 17 | 3.4 | 34 |
| 18 | 3.6 | 36 |
| 19 | 3.8 | 38 |
| 20 | 4 | 40 |
| 21 | 4.2 | 42 |
| 22 | 4.4 | 44 |
| 23 | 4.6 | 46 |
| 24 | 4.8 | 48 |

DNA skladujte při -20 °C nebo ihned proveďte amplifikaci.

Je možná automatizace postupu. Pro další informace kontaktujte Fujirebio Europe N.V. nebo vašeho lokálního distributora (viz.

<https://www.fujirebio.com/en/resource-center/automated-test-procedures>).

Jiná automatizovaná řešení vyžaduje vnitřní validaci před použitím analýzy.

(2) První proud moči konzervovaný UCM

Příprava vzorků prvního proudu moči.

První část proudu moči (= první moč nebo FVU) zachycuje hlen a úlomky exfoliovaných buněk ženských pohlavních orgánů, včetně děložního čípku. Proto první odebraná část moči obsahuje výrazně více HPV DNA než následující část. Colli-Pee (Novosanis) je pomůcka pro efektivní záchyt FVU - prvních 20 ml vzorku moči. Do sběrné zkumavky je přidán UCM-konzervant. Bylo prokázáno, že přidání konzervantu nukleové kyseliny do vzorků moči zabrání degradaci buněčné DNA nukleázou během transportu, skladování a pre-analytických postupů.

Izolace DNA pomocí QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

Tento postup je založen na pracovním návodu soupravy QIAamp DNA Mini Kit.

1. Přeneste 200 µl vzorku do 1,5 ml zkumavky a přidejte 20 µl proteinázy K a 200 µL pufru AL (lyzační pufr).
2. Míchejte pulzním vortexem po dobu 15 sekund. Inkubujte při 56 ° C po dobu 30 minut.
3. Krátce centrifugujte 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavku.
4. Přidejte 200 ul ethanolu (96-100%). Míchejte pulzním vortexem po dobu 15 sekund. Krátce odstředte 1,5 ml zkumavku s mikrocentrifugou.
5. Pipetujte směs (620 ul) do kolonky QIAamp spin column (ve 2 ml odběrové zkumavce).
6. Centrifugujte 1 minutu při 8000 ot / min.
7. Zlikvidujte průtokovou a odběrovou zkumavku. Umístěte kolonu QIAamp spin do čisté odběrové zkumavky. Přidejte 500 µl pufru AW1 do kolonky QIAamp spin column. Centrifugujte po dobu 1 minuty při 8000 ot / min. Zlikvidujte proteklou kapalinu a odběrovou zkumavku. Umístěte kolonku QIAamp column do čisté odběrové zkumavky.
8. Přidejte 500 µl pufru AW2 do kolonky QIAamp spin column. Centrifugujte po dobu 3 minut při
9. 14000 ot / min. Zlikvidujte proteklou kapalinu a odběrovou zkumavku. Umístěte kolonku QIAamp spin column v čisté sběrné zkumavce. Centrifugujte po dobu 1 minuty při 14000 ot / min.
10. Zlikvidujte proteklou kapalinu a sběrnou zkumavku. Umístěte kolonu QIAamp spin do čisté 1,5 ml zkumavky pro mikrocentrifugu.
11. Přidejte 50 µl pufru AE (eluční pufr). Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Centrifugujte po dobu 1 minuty při 8000 ot / min.
Mikrocentrifugační zkumavka obsahuje eluovanou DNA.
DNA skladujte při -20 °C nebo pokračujte v amplifikaci.

(3) Vzorek tkáně fixované ve formalínu a zalité v parafinu (FFPE):

Doporučuje se izolace DNA pomocí standardního protokolu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN).

Pracovní postup:**POZNÁMKA:**

- Tento protokol byl určen pro optimální amplifikaci v 0,2 ml PCR zkumavkách v termocykleru GeneAmp® PCR System 9700.
- Tento protokol může být použit pro většinu komerčních typů termocyklerů, ale může vyžadovat nějaké modifikace, na které upozorňuje výrobce cykleru.
- Před používáním stanovte, zda je protokol kompatibilní s termocyklerem používaným ve vaši laboratoři.
- Ujistěte se, že termocykler je před použitím kalibrovaný.

Příprava směsi PCR

Je velmi důležité použít správné množství každé složky. Příliš velký nebo příliš malý vzorek nebo množství činidel by mohlo zapříčinit nespecifickou amplifikaci nebo dokonce vůbec žádnou amplifikaci.

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA: Připravte směs PCR na ledu a vyvarujte se každého zdržení i při přípravě běhu.

1. Stanovte počet lahviček, které mají být připraveny (N) jako:
N = počet vzorků DNA + 1 (negativní kontrola; bez DNA) + 1 (pozitivní kontrola)
2. Objem Master Mixu pro jeden vzorek je 40 µl.
3. 40 µl Master Mixu dejte do amplifikačních zkumavek bez DNA/DNAsy. Pokud je potřeba, pokryje se směs PCR minerálním olejem.
4. 10 µl extrahovaného materiálu se pipetuje do směsi PCR. Přidá se 10 µl kontrolní DNA do pozitivní kontrolní zkumavky. Do zkumavky s negativní kontrolou se přidá 10 µl destilované vody bez DNA/DNasy.
5. Vzorky se umístí do předehřátého a kalibrovaného termobloku (viz pokyny výrobce). Zapne se program amplifikace pro INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*.

Cyklus PCR

Pro INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* amplifikaci by měl být vybrán správný průběh teploty.

Tabulka 2: Průběh INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* amplifikace (typ termocykleru: GeneAmp PCR System 9700):

| | <u>Krok</u> | <u>Teplota</u> | <u>Čas</u> | |
|----|--------------------|-----------------------|-------------------|---|
| 1. | Dekontaminace | 37 °C | 10 min | Degradace uracilu obsahujícího DNA |
| 2. | Denaturace | 94 °C | 9 min | Inaktivace UNG a aktivace DNA polymerázy AmpliTaq Gold® |
| 3. | Denaturace | 94 °C | 30 s | <i>Opakujte kroky</i> |
| 4. | Annealing primerů | 52 °C | 45 s | <i>3 až 5 cyklu</i> |
| 5. | Extend primerů | 72 °C | 45 s | <i>40 krát</i> |
| 6. | Udržování na 72 °C | | | po dobu < 2 hodiny |

Vyjměte zkumavky z termocykleru, amplikon ihned uskladněte při -20 °C ± 5 °C nebo ihned zpracujte INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*.

POZNÁMKA:

Neskladujte amplifikované DNA produkty společně s amplifikačními činidly.

Výsledky**Validace**

- Zařadte alespoň jednu pozitivní a jednu negativní kontrolu do každého běhu amplifikace. Jako v každém novém pracovním postupu by měla být zvaženo zahrnutí dalších pozitivních a negativních kontrol, dokud se nedosáhne vysoké spolehlivosti ve schopnosti správně provádět tento pracovní postup.
- Pokud je vhodné zahrnout další pozitivní kontrolu, použijte známý pozitivní vzorek.

Omezení postupu

- Používání tohoto výrobku by mělo být omezeno na personál, který je dobře vyškolen v technikách amplifikace.
- Prášek z jednorázových rukavic a chlornan sodný mají inhibiční účinky na amplifikaci.
- Silně hemolyzované vzorky mohou inhibovat amplifikaci PCR a výsledkem jsou falešné negativní výsledky.
- Nebyly prováděny experimenty testování vlivu možných interferujících látek.
- Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků DNA může snížit účinnost amplifikace.
- Specifická amplifikace závisí na správné laboratorní praxi a pečlivém provedení postupu popsaného v odstavcích **Analytická opatření a Doporučení pro organizaci laboratoře a postupů.**

Provádění testu

Viz návod INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*.

Doporučení pro organizaci laboratoře a postupů

Doporučujeme následující pořadí operací:

1. – Příprava a alikvotování PCR směsí;
2. – Příprava vzorků (izolace DNA);
3. – PCR – Polymerázová řetězová reakce;
4. – Analýza produktů biotinylovaného PCR metodou reverzní hybridizace.

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, by se potom 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 - uchování a příprava činidel

Tato místnost a její zařízení musí být udržovány **bez DNA**. Tato místnost se používá pouze pro přípravu činidel PCR. Pozitivní kontrola by neměla být přinášena do místnosti 1. Personál, vstupující do této místnosti, by měl nosit čistý laboratorní plášť, který nesmí nosit mimo tuto místnost. Při manipulaci s činidly, se musí používat jednorázové rukavice.

Místnost 2 - příprava vzorků

Tato místnost a její zařízení musí být udržovány **bez amplimerů**. Personál, vstupující do této místnosti, by měl nosit čistý laboratorní plášť, určený pouze pro tuto místnost. Při přípravě vzorků se musí používat jednorázové rukavice, které se musí často měnit. Opatrně odzátkujte lahvičku obsahující (zpracovávaný) vzorek. Zamezte, aby najednou byla otevřena více než jedna reakční lahvička se vzorkem.

Aby se zabránilo kontaminaci a čištění kontaminovaných povrchů doporučuje se čistit pipety a pracovní povrchy pomocí DNAZap™ (Ambion). Uvědomte si, že používání DNAZap™ je pouze další bezpečnostní opatření a popsaná doporučení na organizaci laboratoře a postupů by měla být tak striktně, jak je jen možné.

Místnost 3 - amplifikace a detekce amplimeru

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

Obchodní značky

- INNO-LiPA je obchodní značka společnosti Fujirebio Europe N.V., registrované ve Spojených státech a dalších zemích.
- GeneAmp je registrovaná obchodní značka společnosti Applied Biosystems, LLC.
- QIAamp je registrovaná obchodní značka společnosti QIAGEN Group.
- DNAZap je obchodní značka společnosti Ambion Inc., USA.
- PreservCyt je registrovaná obchodní značka společnosti Hologic Inc., USA.
- SurePath je obchodní značka společnosti BD Diagnostics, USA.
- AmpliTaq Gold je registrovaná obchodní značka společnosti Roche Molecular Systems Inc., USA.
- Colli-Pee je obchodní značka firmy Novosanis.

Odkazy - Reference

- Molijn A, et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*, 2005;32S:S43-S51.
- 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.
- Gilbert L, et al. Stability of Cervical Specimens in SurePath Medium for Human Papillomavirus Testing with the Roche cobas 4800 Assay. *J Clin Microbiol*, 2013;51(10):3412–3414.
- 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.
- 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.
- Meers N, et al. Storage and transport recommendations for first-void urine samples, May 2021 (source: website Novosanis).
- 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.
- 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.
- Kokkat TJ, et al. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank*, 2013;11(2):101-106.
- Park JY, et al. Impact of specimen age on its DNA quality for Formalin-Fixed Paraffin- Embedded HPV specimens. 2018;10.1101/420224.
- Nicolás-Párraga S, et al. Human DNA decays faster with time than viral dsDNA: an analysis on HPV16 using pathology archive samples spanning 85 years. *Virology Journal*, 2021;18(65).