

Biochip a DNA di HPV

PapilloCheck®

Istruzioni per l'uso

288
analyses

Kit diagnostico per la genotipizzazione di papillomavirus umano dei tipi 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 in campioni cervicali

RIF 465 088

Per uso diagnostico in-vitro unicamente da parte di personale di laboratorio qualificato

Revisione: BQ-361-00
Giugno 2014



Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Germania
Tel.: +49 (0) 7022 948-0 • Fax: +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com


greiner bio-one

CE IVD
Prodotto in Austria



288

GLOSSARY OF SYMBOLS

											
en	Batch code	Use by	Consult Instructions for Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Diagnostic Medical Device	Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Danger	Store in the dark	Important Note
de	Chargenbezeichnung	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-Vitro-Diagnostika Medizinprodukt	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Gefahr	Im Dunkeln lagern	Wichtiger Hinweis
fr	N° de lot	Date limite de conservation jusqu'au	Lire les instructions avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	Danger	À stocker à l'abri de la lumière	Note importante
es	Código de lote	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	Peligro	Conservar en un lugar oscuro	Nota importante
it	Codice del lotto	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limitazione temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Pericolo	Conservare al buio	Nota importante
pt	Código do lote	A utilizar preferivelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	Perigo	Conservar num local escuro	Aviso importante
nl	Lot nummer	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperring	Voldoende inhoud voor <n> tests	Gevaar	Donker bewaren	Belangrijke opmerking
da	Lotnummer	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskåicin doag-nose-apparat	Temperaturbegrænsær	Indeholder nok til <n> test	Fare	Opbevarer mørkt	Vigtig henvisning
sv	Lot nummer	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro medicinsk doag-nostisk apparatur	Temperaturbegränsning	Innehållet räcker till <n> tester	Fara	Förvaras mörkt.	Viktigt meddelande
pl	Kod partii	Termin zdatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produkt yw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	NIEBEZPIECZ ENSTWO	Przechowywać w ciemności	Ważne
no	batch nr.	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	Fare	Oppbevarer mørkt	Viktig merknad
el	κωδικός παρτίδας	το λιγότερο διατηρείται	πριν την χρήση διαβάστε τις οδηγίες	Αριθμός Καταλόγου	Παραγωγός	In vitro διαγνωστικά ιατρικά προϊόντα	περιορισμός θερμοκρασίας	Περιεχόμενο αρκετό για <n> τεστ	ΚΙΝΔΥΝΟΣ	Αποθηκεύεται στα σκοτεινά	Σημαντική υπόδειξη
tr	Parti kodu	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tehlikeli	Karanlık yerde saklayınız	Önemli Not

INDICE

1. CONTENUTO DEL KIT	5
2. MATERIALI DI CONSUMO, APPARECCHIATURE E STRUMENTI RICHIESTI	6
3. SPEDIZIONE E CONSERVAZIONE	8
4. ISTRUZIONI DI SICUREZZA	8
5. SMALTIMENTO DEI RIFIUTI	9
6. INTRODUZIONE	10
6.1 USO PREVISTO	10
6.2 TIPI DI HPV RILEVABILI CON PAPIILOCHECK®	10
6.3 PRINCIPI DI ANALISI	11
6.4 STRUTTURA DEL BIOCHIP A DNA PAPIILOCHECK®	13
6.4.1 Disposizione del biochip PapilloCheck®	13
6.4.2 Controlli su biochip	14
7. ISTRUZIONI PER IL FLUSSO DI LAVORO DI PAPIILOCHECK®	15
7.1 ISTRUZIONI GENERALI	15
7.2 SEPARAZIONE DEI LOCALI	15
7.3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI	16
7.3.1 Prevenzione delle contaminazioni	16
7.3.2 Istruzioni per la manipolazione dei biochip a DNA	16
7.3.3 Precauzioni generali	16
7.3.4 Lavorare in sicurezza	17
8. PROCEDURA DI PAPIILOCHECK®	18
8.1 PRELIEVO DEL CAMPIONE ED ESTRAZIONE DEL DNA	18
8.1.1 Prelievo del campione	18
8.1.2 Estrazione del DNA	20
8.2 REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)	21
8.2.1 Impostazione del ciclatore termico	21
8.2.2 Trattamento con uracil-N-glicosilasi (UNG)	22
8.2.3 Preparazione della reazione di PCR	23
8.2.3.1 Procedura automatizzata di preparazione della PCR con CheckExtractor™	23
8.2.3.2 Procedura manuale di preparazione della PCR	31
8.2.4 Sigillatura e conservazione delle piastre	32
8.2.4.1 Sigillatura e conservazione della piastra di eluizione	32
8.2.4.2 Sigillatura della piastra PCR	32
8.2.4.3 Richiusura della piastra PCR	33
8.3 IBRIDAZIONE E LAVAGGIO	34
8.3.1 Preparazione e disposizione	34
8.3.2 Ibridazione	36
8.3.3 Lavaggio ed essiccamento	38
8.4 SCANSIONE E VALUTAZIONE DEL BIOCHIP PAPIILOCHECK®	40

9. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	41
10. ASSISTENZA TECNICA	42
11. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI DI PAPILOCHECK®	43
11.1 PRESTAZIONI ANALITICHE DI PAPILOCHECK®	43
11.1.1 Sensibilità analitica	43
11.1.2 Specificità analitica – tipi di HPV.....	44
11.1.3 Specificità analitica – organismi diversi dall'HPV.....	44
11.2 RIPETIBILITÀ	45
11.3 RIPRODUCIBILITÀ	46
11.4 EFFICACIA	47
11.5 EFFICIENZA CLINICA DI PAPILOCHECK®	48
12. PROTOCOLLO BREVE DI PAPILOCHECK®	50
12.1 LOCALE 2: PREPARAZIONE DELLA MASTERMIX FINALE	50
12.2 PREPARAZIONE DELLA PCR	51
12.2.1 Locale 1: preparazione automatizzata della PCR con CheckExtractor™	51
12.2.2 Locale 2: preparazione manuale della PCR	52
12.3 LOCALE 3: IBRIDAZIONE - PREPARAZIONE / REAZIONE DI IBRIDAZIONE	53
12.4 LOCALE 3: LAVAGGIO ED ESSICCAMENTO / SCANSIONE E VALUTAZIONE	54

1. CONTENUTO DEL KIT

Kit PapilloCheck® ¹	Contenuto	Quantità
PCR MasterMix	6 x PCR MasterMix PapilloCheck® ²	6 x 1.200 µl ciascuno
Preparazione MasterMix	6 x fiale per preparazione MasterMix	6 x vuote
Scatola portavetrini, 4 array da 12	6 x scatola portavetrini PapilloCheck® con 4 biochip PapilloCheck® ³	24 array da 12
Tampone di ibridazione	12 x PapilloCheck® Tampone di ibridazione	12 x 1.000 µl
Concentrato per tampone A	1 x tampone A PapilloCheck® concentrato	1 x 450 ml
Concentrato per tampone B	1 x tampone B PapilloCheck® concentrato	1 x 55 ml

¹ Un kit PapilloCheck® è sufficiente per analizzare 288 campioni.

² Contiene tutti i componenti necessari per la PCR ad eccezione della DNA polimerasi termostabile (Taq) e della uracil-N-glicosilasi.

³ Un biochip PapilloCheck® contiene 12 microarray PapilloCheck®.

La confezione principale contiene un flacone di tampone A e uno di tampone B concentrato e sei scatole di cartone piccole. Ciascuna di queste scatole contiene altro materiale per le 48 analisi, ovvero: una fiala di PCR MasterMix, una fiala per la preparazione della MasterMix, due fiale di tampone di ibridazione e una scatola portavetrini con quattro biochip PapilloCheck®. Tale confezione conferma ulteriormente che il presente kit non è destinato al trattamento di lotti inferiori a 48 campioni.

2. MATERIALI DI CONSUMO, APPARECCHIATURE E STRUMENTI RICHIESTI

Si raccomanda di utilizzare PapilloCheck® con i materiali di consumo, le apparecchiature e gli strumenti indicati, e ricorrendo unicamente a personale qualificato.

Materiali di consumo	N. cat. Greiner Bio-One	Quantità
PapilloCheck®	465 088	Kit per 288 reazioni
Kit di raccolta PapilloCheck®	465 075	50 campioni
Kit di estrazione del DNA oCheck® / Preparazione con colonnina singola	515 040	50 preparazioni
Kit di estrazione del DNA oCheck® - CheckExtractor™	517 070	288 preparazioni
Puntali con filtro sterili e privi di DNasi per micropipetta¹		
	765 288	96/960
Puntali con filtro da 0,5-10 µl	774 288	96/960
Puntali con filtro da 0,5-20 µl	772 288	96/960
Puntali con filtro da 10-100 µl	739 288	96/960
Puntali con filtro da 10-200 µl	750 288	60/600
Puntali con filtro da 100-1000 µl		
Puntali per pipette per CheckExtractor™		
Puntali per pipette da 300 µl	865 807	5760
Puntali per pipette da 1000 µl	866 806	3890
Tubi di reazione privi di DNasi e piastre²		
Tubo di reazione da 1,5 ml	616 201	500/4000
Tubo di reazione da 0,2 ml ²	683 201	500/1000
Strip per PCR (8 x 0,2 ml)	673 210	125/1250
Tappi per strip per PCR (8 x 0,2 ml)	373 270	125/1250
Piastra PCR con codice a barre	652 290-CEX	40
Sigillatura		
Pearce Seal	865 804	100
Silver Seal	676 090	100
Provetta di polipropilene da 50 ml ³	210 261	25/450
Pipette di plastica		
	607 180 o 607 160	1/200
	760 180 o 760 160	1/200
	786 180 o 768 160	1/200

¹ Alcuni dei puntali indicati sono opzionali in base alle micropipette disponibili.

² In linea di massima si raccomanda di usare strip per PCR da 8 provette. Se le strip non sono disponibili, usare i tubi di reazione singoli opzionali (da 0,2 ml). In combinazione con CheckExtractor™ devono essere utilizzate piastre PCR con codice a barre.

³ Necessaria solo se non è disponibile la centrifuga per vetrini.

Apparecchiature	N. cat. Greiner Bio-One	Quantità
CheckScanner™	862 070	1
Software CheckReport™ versione base	862 080	1
Software CheckReport™, plug-in per PapilloCheck®	862 081	1
Computer per CheckScanner™ e software CheckReport™	862 900	1
Camera di ibridazione oCheck® con portavetrini	447 070	1
Maniglia per portavetrini	447 001	1
Vaschetta di lavaggio oCheck® ⁴	447 020	1
CheckExtractor™	863 080	1
Termosigillatrice	865 802	1
Adattatore per termosigillatrice	865 803	1
Centrifuga per piastre	865 805	1
Enzimi richiesti		
<ul style="list-style-type: none"> • Taq polimerasi: DNA polimerasi HotStarTaq® 5 U/µl (Qiagen; 203203, 203205, 203207, 203209) • Uracil-N-glicosilasi: uracil-DNA glicosilasi 1 U/µl (Fermentas; n. EN0361, n. EN0362) 		
Altri materiali di consumo necessari		
<ul style="list-style-type: none"> • Acqua ultrapura per biologia molecolare, testata mediante PCR • Acqua distillata o deionizzata • Guanti monouso 		
Altre apparecchiature necessarie		
<ul style="list-style-type: none"> • Microcentrifuga per tubi di reazione da 1,5 e 2 ml • Centrifuga per provette di polipropilene da 50 ml (ad esempio BeckmanCoulter: centrifuga Allegra X-22; rotore ad angolo fisso C0650) o centrifuga per vetrini (ad esempio Labnet: Slide Spinner; VWR International: centrifuga Galaxy MiniArray) • Microcentrifuga per tubi di reazione singoli da 0,2 ml o strip per PCR da 8 provette (ad esempio Labnet: centrifuga Spectrafuge Mini)⁵ • Termociclatore per PCR: GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems), termociclatore Veriti™ a 96 pozzetti (Applied Biosystems) o peqSTAR 96X Universal (PEQLAB Biotechnology GmbH) • Bagno termostatico (50°C) • Micropipette (range da 1 a 1000 µl) • Pipetta a 8 canali (intervallo: 5 - 50 µl), ad esempio Brand Transferpette®-8 (Brand) • Pipettatore per pipette in vetro e plastica • Agitatore vortex • Rack per diversi tubi di reazione 		

⁴ Per la procedura di lavaggio PapilloCheck® occorrono tre vaschette oCheck®.

⁵ Necessarie soltanto in caso di preparazione manuale della PCR. Per la preparazione automatizzata della PCR, occorre utilizzare piastre PCR.

3. SPEDIZIONE E CONSERVAZIONE

Il kit PapilloCheck® viene spedito a temperatura ambiente, ma al momento di riceverlo deve essere immediatamente riposto a **4-8°C** in un ambiente protetto dalla luce. Se conservati correttamente, il kit PapilloCheck® e i suoi componenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata. Inoltre, rispettando queste condizioni la durata non varia rispetto alla data di scadenza anche dopo la prima apertura del kit e dei relativi componenti.

4. ISTRUZIONI DI SICUREZZA

Il kit PapilloCheck® è destinato all'uso esclusivamente per attività di laboratorio, e non per fini farmacologici, per usi domestici o di altra natura. Il prodotto deve essere utilizzato unicamente da operatori qualificati, come tecnici o medici con formazione specifica nelle tecniche di biologia molecolare.



Indossare sempre un camice da laboratorio adatto, guanti monouso e occhiali di protezione, e seguire le istruzioni di sicurezza fornite in questa sezione e nella sezione 7.3.

Informazioni sulle normative:

In conformità con il Regolamento CE N. 1272/2008, le confezioni interne devono essere etichettate soltanto con simboli e il codice di identificazione del prodotto.

Il contenuto dei seguenti componenti del kit PapilloCheck® è nocivo o pericoloso.

Componente del kit Quantità Contenuto pericoloso	Classificazione conforme al Regolamento (CE) N. 1272/2008	Pittogramma GHS e avvertenza	Indicazioni di pericolo e precauzionali	
PapilloCheck® Tampone di ibridazione, soluzione di guanidina tiocianato, 25-50 %, n. CAS 593-84-0	tossicità acuta, orale (categoria 4) tossicità acuta, inalazione (categoria 4) tossicità acquatica cronica (categoria 3) corrosivo per la pelle (categoria 1c)	 PERICOLO	H302 H332 H314 H412 P273 P280 P305+P351 + P338 EUH032	Nocivo per ingestione. Nocivo per inalazione. Causa gravi ustioni cutanee e lesioni oculari. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P273 Non disperdere nell'ambiente. P280 Utilizzare guanti/indumenti protettivi. Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare cautamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Rivolgersi immediatamente a un CENTRO ANTIVELENI o a un medico.
Tampone B PapilloCheck®, soluzione di sodio dodecilsolfato, 10-20 %, n. CAS 151-21-3	irritazione cutanea (categoria 2) lesioni oculari gravi (categoria 1)	 PERICOLO	H315 H318 P280 P305+P351 + P338	Causa irritazione cutanea. Causa lesioni oculari gravi. Indossare guanti di protezione. Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare cautamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

La versione aggiornata della scheda contenente i dati di sicurezza di questo prodotto può essere scaricata dal sito web di Greiner Bio-One: www.gbo.com/bioscience/biochips_download

5. SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Dopo aver sottoposto il biochip PapilloCheck® a lavaggio ed essiccamento, le soluzioni di lavaggio I, II e III possono essere smaltite senza speciali precauzioni. Smaltire i biochip PapilloCheck® usati, i componenti inutilizzati del kit e la miscela di ibridazione non utilizzata con i rifiuti chimici del laboratorio. Rispettare le normative nazionali e locali in materia di smaltimento.

6. INTRODUZIONE

Di fatto, quasi tutti i casi di carcinoma della cervice – la seconda neoplasia femminile per frequenza nel mondo – si associano a una persistente infezione da papillomavirus umano di tipo cancerogeno (HPV)¹. Ad oggi sono stati isolati oltre 100 tipi diversi di HPV, dei quali circa 40 vengono trasmessi tramite contatto sessuale ed infettano la mucosa genitale. I tipi di HPV cervicale sono classificati in due gruppi: ad alto rischio (HPV ad alto rischio o hrHPV) e a basso rischio (HPV a basso rischio o lrHPV). Mentre i tipi di HPV ad alto rischio si associano ad un aumento del rischio di sviluppare il carcinoma della cervice, gli HPV a basso rischio sono soprattutto responsabili dei condilomi benigni che colpiscono l'area genitale². Tuttavia, anche nel gruppo ad alto rischio, il rischio relativo di sviluppare il cancro o lesioni cervicali intraepiteliali (CIN) dipende dal tipo³. Il 70% circa di tutti i casi di carcinoma della cervice si correla a una persistente infezione da HPV 16 o 18, mentre i tipi a basso rischio di maggiore prevalenza sono HPV 6 e 11. Sulla base del collegamento eziologico pressoché assoluto tra HPV cancerogeni e cancro della cervice, la ricerca degli hrHPV rientra oggi tra le principali metodiche di screening per questo tipo di tumore⁴.

6.1 Uso previsto

PapilloCheck® è un kit diagnostico per la rilevazione qualitativa e la genotipizzazione di 24 tipi di papillomavirus umano in preparati di DNA ottenuti da strisci cervicali umani. L'uso del kit è riservato esclusivamente a personale qualificato.

PapilloCheck® soddisfa i requisiti indicati nella direttiva relativa ai dispositivi medico-diagnostici in-vitro (98/79/CE) e pertanto è provvisto del marchio di conformità CE. I risultati diagnostici generati con PapilloCheck® devono essere interpretati in associazione ad altri riscontri clinici o di laboratorio.

Per la preparazione automatizzata della PCR, si raccomanda di utilizzare il kit PapilloCheck® insieme a CheckExtractor™. Tale kit è stato ideato per analizzare lotti di 48 o 96 campioni, e **NON** è pertanto destinato al trattamento di un numero di campioni inferiore a 48.

6.2 Tipi di HPV rilevabili con PapilloCheck®

PapilloCheck® consente di individuare 18 tipi di papillomavirus umano (HPV) ad alto rischio (■) e 6 tipi a basso rischio (□) (tabella 1).

Tabella 1: tipi di HPV rilevabili con PapilloCheck®

HPV 16	HPV 45	HPV 59	HPV 6
HPV 18	HPV 51	HPV 66	HPV 11
HPV 31	HPV 52	HPV 68	HPV 40
HPV 33	HPV 53	HPV 70	HPV 42
HPV 35	HPV 56	HPV 73	HPV 43
HPV 39	HPV 58	HPV 82	HPV 44 / HPV 55*

* PapilloCheck® non consente la differenziazione tra HPV 44 e HPV 55.

¹ Walboomers, J. et al (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 189(1):12-9.

² Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16:1–17.

³ Bosch F.X. et al. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 26 Suppl 10:K1-16.

⁴ Meijer, C.J. et al. (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. Int J Cancer. 124(3):516-20.

6.3 Principi di analisi

PapilloCheck® è un kit basato su microarray per l'individuazione e la genotipizzazione di un frammento del gene E1 del genoma del papillomavirus umano (HPV). La procedura di analisi è riassunta nella **figura 1**.

Prima di procedere all'analisi con PapilloCheck® è necessario estrarre il DNA da un campione di striscio cervicale. Il kit PapilloCheck® non include il prelievo del campione e l'estrazione del DNA. Greiner Bio-One offre prodotti specifici per il prelievo dei campioni (kit di raccolta PapilloCheck®) e l'estrazione del DNA (kit di estrazione del DNA oCheck®), da acquistare separatamente (vedere le indicazioni per l'ordinazione nella sezione 2).

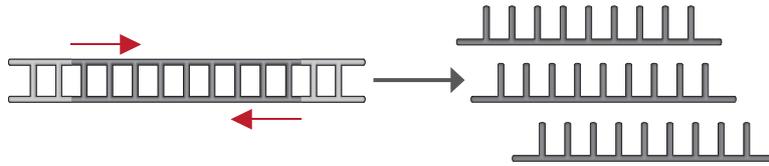
Dopo avere estratto il DNA genomico umano e virale dal campione cervicale, un frammento di 350 bp del gene virale E1 viene amplificato mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando una serie di primer specifici per l'HPV. Nella stessa reazione, un frammento del gene umano a singola copia ADAT1 (adenosina deaminasi 1 umana tRNA specifica) viene amplificato per controllare la presenza di materiale campione umano nel campione cervicale (controllo campione), mentre un template di controllo interno alla PCR MasterMix di PapilloCheck® viene amplificato per controllare l'efficienza della PCR (controllo PCR). Inoltre, la PCR MasterMix di PapilloCheck® contiene dUTP. Pertanto, è possibile eliminare la potenziale contaminazione crociata da precedenti reazioni di PCR utilizzando un trattamento a base di uracil-N-glicosilasi (UNG) (vedere la sezione 8.2.2).

I prodotti di PCR vengono quindi ibridati su specifiche sonde di DNA e controlli fissati sulla superficie dei biochip PapilloCheck®. Ogni biochip contiene 12 microarray di DNA che permettono di analizzare contemporaneamente 12 campioni cervicali. Durante l'ibridazione il DNA legato viene marcato con una sostanza fluorescente, mentre il DNA non legato viene eliminato nelle successive fasi di lavaggio. L'efficienza dell'ibridazione è sottoposta a controllo (controllo ibridazione).

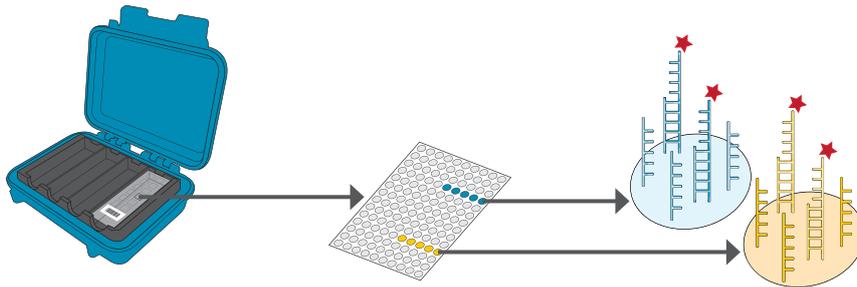
Infine, il biochip PapilloCheck® viene automaticamente sottoposto a scansione, analisi e valutazione con CheckScanner™ e il software CheckReport™ (vedere le indicazioni per l'ordinazione nella sezione 2). CheckScanner™ è uno scanner laser bicromatico (lunghezze d'onda di eccitazione di 532 nm e 635 nm) che consente di rilevare il segnale fluorescente generato dalla presenza di prodotti di amplificazione specifici dell'HPV e dai controlli (vedere paragrafo 6.4.2). Il software CheckReport™ consente di visualizzare, analizzare e valutare i risultati e mostra automaticamente i valori dei tipi di HPV rilevati e dei controlli in un report dettagliato.

Il report indica chiaramente la presenza o l'assenza di uno o più dei 24 tipi di HPV rilevabili. I controlli completi sui biochip rendono l'analisi molto affidabile.

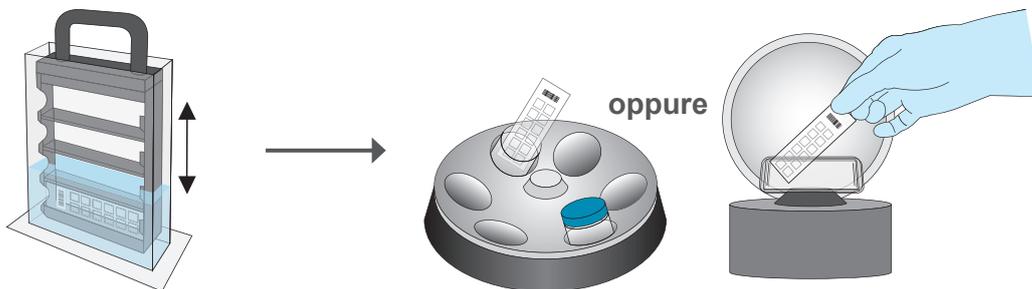
1. reazione di PCR



2. Ibridazione



3. Lavaggio ed essiccamento



4. Scansione e analisi

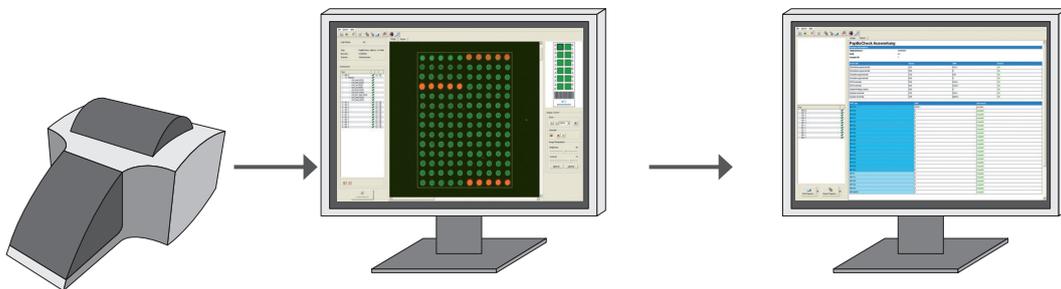


Figura 1: procedura di analisi con PapilloCheck®

- 1. Reazione di PCR:** dopo l'estrazione del DNA, un frammento di 350 bp del gene virale E1 e frammenti di due bersagli di controllo vengono amplificati mediante PCR. I prodotti di amplificazione vengono quindi ibridati su sonde di DNA complementari sul biochip.
- 2. Ibridazione:** ogni tipo di HPV viene rilevato da una sonda di DNA specifica. Durante l'ibridazione viene applicato il marcatore fluorescente.
- 3. Lavaggio ed essiccamento:** il DNA non legato viene eliminato nelle fasi di lavaggio successive.
- 4. Scansione e analisi:** il biochip PapilloCheck® viene sottoposto a scansione, analisi e valutazione con CheckScanner™ e il software CheckReport™. Viene generato un report che indica chiaramente la presenza o l'assenza di uno o più dei 24 tipi di HPV rilevabili.

6.4 Struttura del biochip a DNA PapilloCheck®

6.4.1 Disposizione del biochip PapilloCheck®

Ogni biochip PapilloCheck® contiene 12 microarray denominati pozzetto A1 - B6. Ogni microarray PapilloCheck® comprende 28 diverse sonde ed è circondato da una cornice rialzata. Ogni sonda è distinta in cinque repliche. La disposizione del microarray PapilloCheck® è illustrata nella **figura 2**, mentre i controlli su biochip sono ulteriormente descritti nella sezione 6.4.2.

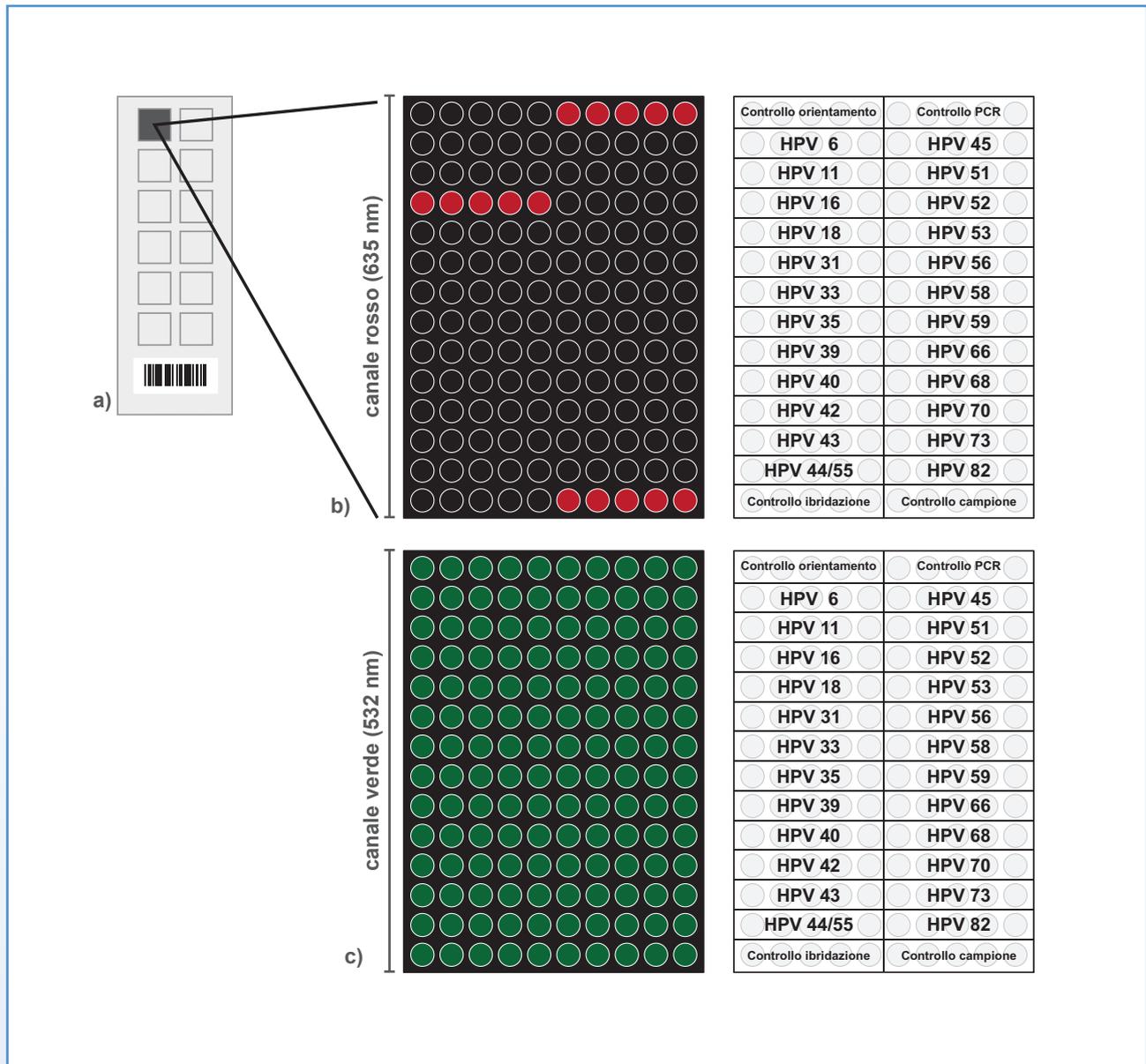


Figura 2: struttura del biochip PapilloCheck®

a) Disegno schematico del biochip PapilloCheck®. **b)** e **c)** Immagini visualizzate dal software CheckReport™ per le due diverse lunghezze d'onda di eccitazione utilizzate per la scansione del canale rosso (b): 635 nm; c) canale verde: 532 nm) e disegni schematici della disposizione del microarray PapilloCheck®. Sono indicati le sonde specifiche per i tipi di HPV e i controlli su biochip.

6.4.2 Controlli su biochip

Il biochip a DNA del PapilloCheck® integra controlli completi. Diversi sistemi di controllo verificano le fasi critiche del saggio e dell'analisi del biochip, comprese la qualità del campione e l'estrazione del DNA (controllo campione), la qualità della reazione di PCR (controllo PCR), l'efficienza dell'ibridazione (controllo ibridazione), nonché l'omogeneità degli spot e la qualità della stampa (controllo orientamento e controllo stampa). Oltre a visualizzare la presenza o l'assenza dei tipi di HPV, il software CheckReport™ mostra automaticamente i valori corrispondenti dei controlli e dei tipi di HPV individuati in un report dettagliato. Per la lettura dei diversi controlli vengono utilizzate entrambe le lunghezze d'onda di eccitazione di CheckScanner™. Per controllare le prestazioni del saggio (controllo campione e PCR) viene utilizzato il canale rosso (lunghezza d'onda di eccitazione di 635 nm), mentre la qualità dell'ibridazione e del biochip (controllo ibridazione, orientamento e stampa) viene valutata nel canale verde (lunghezza d'onda di eccitazione di 532 nm).

Controllo campione

PapilloCheck® controlla la qualità del campione e/o dell'estrazione del DNA amplificando un frammento del gene umano ADAT1 a singola copia (adenosina deaminasi 1 umana tRNA specifica). Se il DNA estratto dal campione cervicale contiene DNA umano in quantità adeguata viene generato un segnale fluorescente negli spot di controllo campione.

Se l'amplificazione di ADAT1 non avviene o è insufficiente, il software CheckReport™ segnala che il controllo campione "non è riuscito" e l'analisi deve essere ripetuta, perché la quantità di cellule nel campione cervicale è insufficiente e/o l'estrazione non è adeguata (vedere la sezione 9).

Controllo PCR

PapilloCheck® controlla anche la qualità della reazione di PCR. L'amplificazione di un template di controllo interno presente nella PCR MasterMix di PapilloCheck® genera un segnale negli spot di controllo PCR sul biochip PapilloCheck®. La qualità della reazione di amplificazione viene anche valutata automaticamente dal software CheckReport™. Se l'efficienza della PCR non raggiunge una soglia predeterminata, il software CheckReport™ segnala che il controllo PCR "non è riuscito" e l'analisi deve essere ripetuta (vedere la sezione 9).

Se la quantità di DNA di HPV nel campione è molto elevata, il segnale fluorescente degli spot di controllo PCR potrebbe essere basso o addirittura assente, a causa della competizione durante la reazione di PCR. In questo caso, per poter considerare valido il test, il segnale fluorescente di almeno una sonda specifica per l'HPV deve superare una soglia predeterminata.

Controllo ibridazione

PapilloCheck® controlla l'efficienza dell'ibridazione utilizzando una sonda marcata con una sostanza fluorescente nel tampone di ibridazione PapilloCheck® che effettua un'ibridazione su sequenze di DNA specifiche sul biochip PapilloCheck®. Un'ibridazione adeguata determina un segnale fluorescente su ciascuno spot dell'array. I risultati di cinque spot di controllo dell'ibridazione sul biochip PapilloCheck® vengono valutati anche dal software CheckReport™.

Controllo orientamento e stampa

Gli spot per il controllo dell'orientamento sul biochip PapilloCheck® generano segnali fluorescenti a prescindere dall'efficacia del processo di ibridazione. Il software CheckReport™ utilizza questi spot come guida per individuare correttamente gli spot, condizione indispensabile per una corretta analisi dei segnali. Inoltre, la qualità del processo di stampa viene controllata dalla presenza di un segnale fluorescente verde su ciascuno spot del biochip (controllo stampa).

7. ISTRUZIONI PER IL FLUSSO DI LAVORO DI PAPILOCHECK®

7.1 Istruzioni generali

L'impiego di tecniche di biologia molecolare all'avanguardia in laboratorio richiede di rispettare alcune istruzioni per garantire la sicurezza del personale e la qualità dei risultati.

In generale, le procedure di biologia molecolare, quali estrazione del DNA, amplificazione e rilevazione dei prodotti di amplificazione, devono essere eseguite da personale adeguatamente qualificato. Inoltre, è necessario un flusso di lavoro pulito e ben strutturato per evitare risultati errati, ad esempio dovuti alla degradazione del DNA o alla contaminazione con prodotti di amplificazione. A tal fine, occorre separare le aree di estrazione, amplificazione e rilevazione, come indicato alla sezione 7.2.

Ogni area deve essere equipaggiata con apparecchiature, materiali di consumo, camici da laboratorio e guanti specifici. Evitare di scambiare camici, guanti o apparecchiature tra le diverse aree.

7.2 Separazione dei locali

La figura 3 mostra un esempio della possibile suddivisione di un laboratorio in tre sezioni distinte.

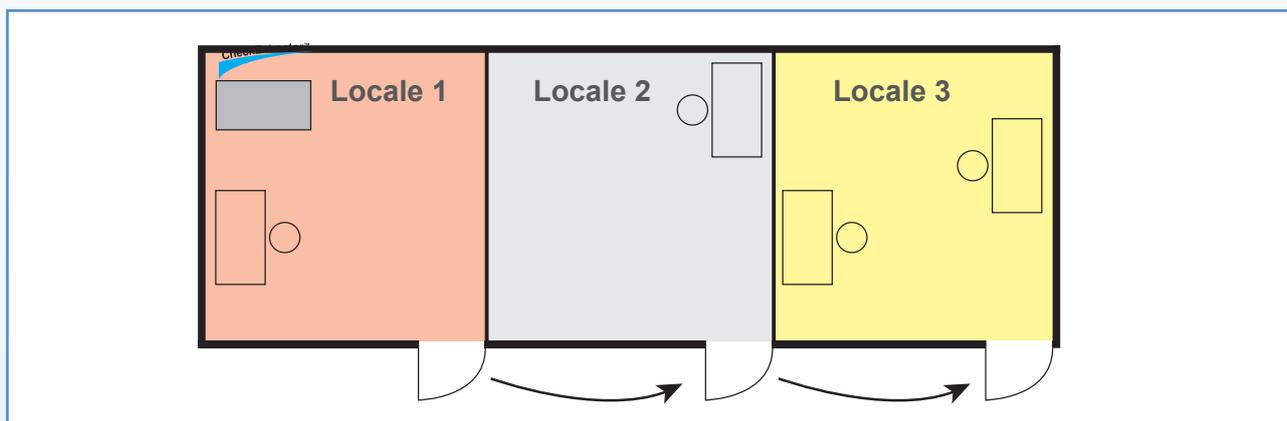


Figura 3: separazione dei locali in un laboratorio

Il locale 1 è destinato all'estrazione del DNA con CheckExtractor™ e al trattamento delle relative piastre di eluzione e PCR. La PCR MasterMix deve essere preparata nel locale 2 (preferibilmente sotto cappa per PCR). Nel locale 3 vengono eseguite le operazioni di ibridazione, lavaggio, essiccazione e analisi del biochip PapilloCheck® trattato mediante CheckScanner™ e il software CheckReport™.

Per evitare la contaminazione dei campioni, ciascun locale deve essere impiegato esclusivamente per l'applicazione o la tecnica indicata. Potrebbe essere utile impiegare colori differenti per evitare lo scambio accidentale di apparecchiature e materiali di consumo tra le diverse aree.

Per una descrizione più dettagliata della separazione dei locali in caso di procedure manuali di estrazione del DNA e di preparazione della PCR, consultare le istruzioni per l'uso del kit PapilloCheck® (RIF 465 060) e del kit di estrazione del DNA oCheck® (RIF 515 070).



Le apparecchiature e i materiali di consumo non devono essere scambiati tra locali o spazi diversi del laboratorio. Pertanto, la presenza di apparecchiature e materiali di consumo in doppio è una necessità e deve essere attentamente considerata.

7.3 Avvertenze e precauzioni

7.3.1 Prevenzione delle contaminazioni

- Il camice deve essere indossato durante l'intero corso delle procedure e sono necessari set di camici differenti per ciascun locale del laboratorio.
- I guanti devono essere indossati in tutte le fasi dell'analisi e vanno cambiati spesso, soprattutto durante l'estrazione del DNA.
- La zona di lavoro deve essere decontaminata con una soluzione detergente idonea.
- Non toccare per nessun motivo la superficie interna del tappo dei tubi di reazione. Per evitare contaminazioni crociate, aprire un solo tubo per volta.
- Per le micropipette usare puntali con filtro provvisti di barriera per aerosol (privi di DNasi, RNasi e DNA umano). Occorre cambiare il puntale per ogni trasferimento di liquido.

7.3.2 Istruzioni per la manipolazione dei biochip a DNA

- I biochip a DNA devono essere usati in ambienti privi di polvere. Evitare il deposito di polvere e altre particelle sulla loro superficie.
- Non toccare la zona di ibridazione sulla superficie del biochip.
- Solo il lato marcato del biochip è destinato all'ibridazione.
- Non usare evidenziatori per identificare i biochip a DNA, in quanto possono determinare fluorescenza aspecifica.
- Gli array di DNA sono monouso. I biochip ibridati non possono essere riutilizzati.
- Conservare i biochip inutilizzati nella confezione originale all'interno del sacchetto con cerniera contenente il materiale igroscopico.

7.3.3 Precauzioni generali

- Questo kit è esclusivamente per uso diagnostico in-vitro e deve essere utilizzato unicamente da personale con formazione specifica nelle procedure di laboratorio di diagnostica in-vitro.
- Alla ricezione, controllare che i componenti del kit non siano danneggiati. Se uno dei componenti appare danneggiato (ad es., flaconi di tampone), contattare il distributore Greiner Bio-One locale. L'uso di componenti danneggiati potrebbe compromettere le prestazioni del kit.
- Non usare il kit PapilloCheck® dopo la data di scadenza.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Non mescolare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Utilizzare unicamente reagenti/apparecchiature forniti con il kit o consigliati dal produttore.
- Sottoporre a regolare taratura/manutenzione le attrezzature di laboratorio, ad esempio micropipette e bagno termostatico.
- Il pipettaggio di piccole quantità di liquido dell'ordine dei microlitri non è facile. Pertanto, è importante adoperare le pipette con la massima accuratezza possibile.
- Per evitare la contaminazione microbica dei reagenti, prestare attenzione nel rimuovere le aliquote dai tubi.
- Tutte le procedure di centrifugazione devono essere eseguite a temperatura ambiente (18-25°C).

7.3.4 Lavorare in sicurezza

- Fare attenzione quando si maneggiano campioni biologici contenenti materiale umano potenzialmente infettivo. Tutti i campioni biologici devono essere maneggiati e smaltiti come se potessero trasmettere agenti infettivi.
- Non pipettare mai soluzioni con la bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici negli ambienti di lavoro.
- Evitare il contatto diretto con i campioni biologici e cercare di non provocare schizzi o spruzzi.
- Quando si lavora con campioni umani, indossare sempre camice da laboratorio, guanti e occhiali protettivi.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti.

8. PROCEDURA DI PAPILLOCHECK®

La sezione seguente descrive in dettaglio le diverse fasi che portano alla generazione di un report particolareggiato, il quale indica chiaramente la presenza o l'assenza di uno o più tra i 24 tipi di HPV rilevabili nei campioni cervicali analizzati. La **Figura 4** riepiloga le diverse fasi di lavoro, indicando anche la sezione del manuale dove si descrive la fase specifica. Le fasi di lavoro devono svolgersi nella sequenza delineata in questo capitolo. Le fasi pratiche sono indicate da una freccia azzurra ➡.



Il kit PapilloCheck® non include il prelievo del campione, l'estrazione del DNA e l'analisi con il software CheckReport™. Pertanto la descrizione di queste fasi di lavoro nell'ambito di questo capitolo è ridotta all'essenziale. Per ulteriori informazioni consultare le opportune istruzioni per l'uso, ad esempio quelle riguardanti il kit di raccolta PapilloCheck®, il kit di estrazione del DNA oCheck®, il kit di estrazione del DNA oCheck® - CheckExtractor™ e il software CheckReport™.

8.1 Prelievo del campione ed estrazione del DNA

8.1.1 Prelievo del campione

Il kit PapilloCheck® non comprende il prelievo del campione. Greiner Bio-One offre un kit specifico per il prelievo di campioni cervicali (kit di raccolta PapilloCheck®) (vedere le indicazioni per l'ordinazione nella sezione 2).

Il DNA preparato con Greiner Bio-One CheckExtractor™, un sistema automatizzato per l'estrazione del DNA e la preparazione della PCR, utilizzando il kit di estrazione del DNA oCheck® - CheckExtractor™ (Greiner Bio-One, 517 070) è idoneo all'analisi PapilloCheck®. Ai fini di tale estrazione automatizzata del DNA, gli strisci cervicali umani devono essere ottenuti con uno dei mezzi o sistemi di raccolta indicati di seguito:

- Kit di raccolta PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, USA)

PapilloCheck® è stato validato anche utilizzando DNA preparato manualmente con il kit di estrazione del DNA oCheck® (Greiner Bio-One, 515 040) a partire da strisci cervicali umani ottenuti con uno dei mezzi o sistemi di raccolta indicati di seguito:

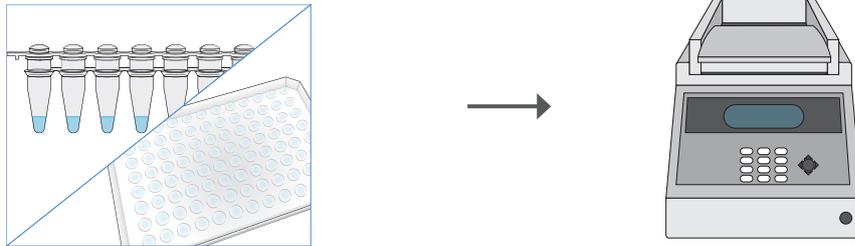
- Kit di raccolta PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germania)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, USA)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
- STM™ (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi)
- Easyfix (Labonord, Templemars, Francia)
- Cyt-All (Alphapath, Maugeio, Francia)

Per ulteriori informazioni sui liquidi di trasporto o sui sistemi di estrazione del DNA adeguati, contattare il distributore locale Greiner Bio-One o consultare il sito web di Greiner Bio-One all'indirizzo www.gbo.com/bioscience/biochips_download.

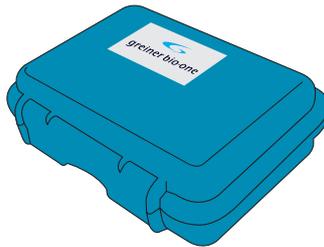
Sezione 8.1.2 Estrazione del DNA



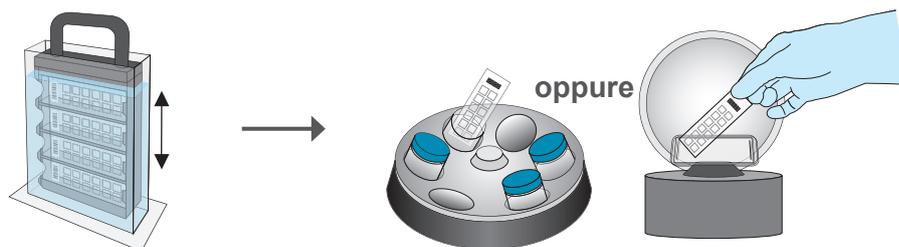
Sezione 8.2 PCR



Sezione 8.3.2. Ibridazione



Sezione 8.3.3 Lavaggio ed essiccamento



Sezione 8.4. Scansione e valutazione

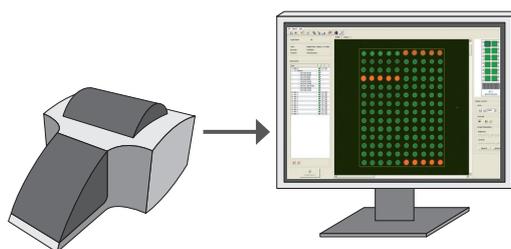


Figura 4: panoramica delle varie fasi di lavoro con PapilloCheck®

8.1.2 Estrazione del DNA

Il kit Papillo**Check**[®] non comprende l'estrazione del DNA. L'estrazione del DNA precedente all'analisi Papillo**Check**[®] deve essere eseguita in modo automatizzato utilizzando il sistema CheckExtractor[™] di Greiner Bio-One in combinazione con il kit di estrazione del DNA oCheck[®] - CheckExtractor[™], oppure in modo manuale utilizzando il kit di estrazione del DNA oCheck[®] di Greiner Bio-One (vedere le indicazioni per l'ordinazione nella sezione 2).

Si raccomanda di utilizzare questo kit Papillo**Check**[®] con CheckExtractor[™] di Greiner Bio-One e il relativo kit di estrazione del DNA, in quanto è stato ideato per trattare lotti di 48 o 96 campioni. Non è destinato al trattamento di un numero di campioni inferiore a 48.

I campioni cervicali prelevati con mezzi o sistemi di raccolta diversi possono venire trattati in modo differente prima dell'estrazione del DNA. Inoltre, esistono differenze nella preparazione dei campioni tra l'estrazione del DNA automatizzata e quella manuale. Per una descrizione dettagliata delle procedure di preparazione dei campioni e di estrazione del DNA, attenersi scrupolosamente alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione del DNA oCheck[®] - CheckExtractor[™] oppure del kit di estrazione del DNA oCheck[®] rispettivamente.

8.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR è un metodo molto sensibile capace di determinare quantità di DNA estremamente piccole. Per evitare di contaminare la reazione occorre adottare speciali precauzioni (vedere Capitolo 7). Polimerasi HotStarTaq® e uracil-N-glicosilasi, necessarie alla reazione, non sono fornite con il kit PapilloCheck® e devono essere acquistate separatamente (vedere la sezione 2).



Il kit PapilloCheck® è stato validato impiegando polimerasi HotStarTaq® di Qiagen e uracil-N-glicosilasi di Fermentas (vedere le indicazioni per l'ordinazione nella sezione 2). L'uso di questi enzimi è indispensabile ed obbligatorio per ottenere risultati corretti.

8.2.1 Impostazione del ciclatore termico

Il kit PapilloCheck® è stato validato con i termociclatori indicati di seguito:

- GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)
- Termociclatore Veriti™ a 96 pozzetti (Applied Biosystems)
- peqSTAR 96X Universal (PEQLAB Biotechnologies GmbH)



Per ottenere risultati corretti è indispensabile usare uno dei termociclatori menzionati in precedenza.

Il programma del termociclatore per la PCR PapilloCheck® è riassunto nella **tabella 2**.

Tabella 2: programma del termociclatore per la PCR PapilloCheck®

Tempo	Temp. °C	N° di cicli
20 min	37°C	1
15 min	95°C	1
30 s	95°C	40
25 s	55°C	
45 s	72°C	
30 s	95°C	15
45 s	72°C	
Sospensione	10°C	

Inoltre, per ogni termociclatore è necessario impostare i seguenti parametri di analisi. Per ulteriori informazioni in merito consultare le istruzioni per l'uso dei diversi termociclatori.

GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Impostare il volume di reazione su 26 µl, la velocità di rampa su "9600" e portare il coperchio a 103°C.

Termociclatore Veriti™ a 96 pozzetti (Applied Biosystems)

Usare lo strumento Convert Method del termociclatore Veriti™ a 96 pozzetti per entrare nel programma di PCR di PapilloCheck® e selezionare "9600 Emulation Mode". Impostare il volume di reazione su 26 µl e la temperatura del coperchio su 103°C.

peqSTAR 96X Universal (PEQLAB Biotechnologies GmbH)

Utilizzare il programma di PCR di PapilloCheck® preimpostato "PapilloCheck.js" fornito insieme al termociclatore. In genere è possibile aprire il programma tramite il seguente percorso: local/Scripts/GreinerBioOne/PapilloCheck.js.

8.2.2 Trattamento con uracil-N-glicosilasi (UNG)⁵

La PCR MasterMix di PapilloCheck® contiene dUTP, che viene incorporato ai prodotti di amplificazione durante la PCR PapilloCheck®, rendendo i prodotti di PCR sensibili alla degradazione ad opera della UNG. La UNG spezza i prodotti di PCR nei siti in cui è stato incorporato un residuo di deossiridilato. I prodotti di PCR spezzati non vengono amplificati nella reazione successiva. Pertanto, un trattamento con UNG può servire per eliminare la contaminazione crociata da precedenti reazioni di PCR⁶.

- Diluire l'uracil-N-glicosilasi in un rapporto di **1:200** in acqua ultrapura per biologia molecolare, testata mediante PCR. Utilizzare una diluizione di UNG fresca per ogni reazione di PCR PapilloCheck® (vedere sezione 8.2.3). Non riutilizzare la UNG diluita.
- Mescolare con cura la diluizione di UNG agitando al vortex per 2 secondi e quindi procedendo allo spin-down oppure pipettando più volte.

La concentrazione originale di uracil-N-glicosilasi è 1 U/μl. La concentrazione della diluizione è quindi 0,005 U/μl.



Il kit PapilloCheck® è stato validato impiegando uracil-N-glicosilasi di Fermentas (vedere la sezione 2). L'uso di questo enzima è indispensabile ed obbligatorio per ottenere i risultati previsti.

- ➡ Aggiungere 1 μl di diluizione a ciascuna reazione di PCR PapilloCheck® (vedere la sezione 8.2.3, tabella 3).

Questa quantità è sufficiente ad eliminare la contaminazione crociata da PCR precedenti. Evitare soluzioni di UNG a concentrazioni maggiori, in quanto ciò potrebbe interferire con l'efficienza della PCR e ridurre la sensibilità di PapilloCheck®.

In genere, per il trattamento con la UNG la miscela di reazione di PCR viene incubata per 20 minuti a 37°C. Successivamente la UNG viene inattivata da una ulteriore incubazione di 15 minuti a 95°C. Queste due fasi sono già integrate nella PCR PapilloCheck® e corrispondono alle prime due fasi del programma del termociclatore (vedere la **tabella 2**). Durante la seconda fase (15 minuti a 95°C) si verificano l'inattivazione della uracil-N-glicosilasi e l'attivazione della polimerasi HotStarTaq®.



Il sistema UNG della PCR PapilloCheck® elimina solo la contaminazione crociata da precedenti reazioni di PCR. Altre contaminazioni, ad esempio quelle che possono verificarsi durante la preparazione del campione, l'estrazione del DNA o l'aggiunta del template non vengono eliminate. Pertanto è necessario seguire le istruzioni e le precauzioni speciali per evitare la contaminazione descritte nel Capitolo 7.

⁵ PapilloCheck® viene venduto con una licenza limitata secondo i brevetti statunitensi 5.035.996; 5.683.896; 5.945.313; 6.287.823; e 6.518.026 e i corrispettivi stranieri.

⁶ Longo, M.C., et al., Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, Gene, 93, 125-128, 1990.

8.2.3 Preparazione della reazione di PCR

8.2.3.1 Procedura automatizzata di preparazione della PCR con CheckExtractor™

Ad eccezione della polimerasi HotStarTaq® e della uracil-N-glicosilasi, la PCR MasterMix di PapilloCheck® contiene già tutti i componenti necessari per la reazione di PCR (tampone PCR, MgCl₂, dNTP, primer, template di controllo per PCR). Pertanto, è possibile suddividere la procedura di preparazione della PCR con PapilloCheck® in due parti: la preparazione della mastermix finale mediante l'aggiunta di enzimi alla PCR MasterMix di PapilloCheck® e la preparazione della reazione di PCR finale mediante l'aggiunta del DNA estratto come template. Mentre la prima operazione deve essere realizzata manualmente, la seconda può avvenire in modo automatico con CheckExtractor™ di Greiner Bio-One.



Il kit PapilloCheck® è stato validato impiegando polimerasi HotStar Taq® di Qiagen (vedere la sezione 2). L'uso di questo enzima è indispensabile ed obbligatorio per ottenere i risultati previsti.

Per evitare di contaminare la reazione, è preferibile preparare la mastermix finale in un ambiente protetto, ad esempio sotto cappa per PCR. Per la preparazione occorre utilizzare la fiala con codice a barre appositamente destinata alla preparazione della mastermix, la quale si trova tra le fiale con la PCR MasterMix di PapilloCheck® e il tampone di ibridazione di PapilloCheck® all'interno delle scatole di cartone piccole contenenti ciascuna il materiale per 48 analisi.



Al fine di garantire l'utilizzabilità della mastermix finale per la preparazione della PCR con CheckExtractor™, è indispensabile usare la fiala con codice a barre, poiché quest'ultimo serve per l'identificazione del reagente da parte di CheckExtractor™ durante la procedura.

La quantità di mastermix finale necessaria dipende dal numero di campioni da analizzare e, pertanto, dal numero di reazioni di PCR che devono essere preparate. Per la preparazione della PCR di un numero di campioni fino a 48 occorre una singola fiala con codice a barre riempita con la mastermix finale, mentre per la preparazione della PCR di un numero di campioni fino a 96 sono necessarie due fiale. Qualora debba essere analizzato un numero di campioni inferiore a 48 o 96, ad esempio 43 o 87, la quantità di mastermix da preparare corrisponde a quella destinata a 48 o 96 reazioni. La quantità di mastermix finale necessaria viene calcolata dal software CheckExtractor™.

Pertanto, è essenziale attenersi esattamente alle istruzioni del software durante la preparazione del supporto delle provette. Ricordare che CheckExtractor™ non consente di avviare la preparazione della PCR qualora venga utilizzata una quantità di mastermix finale inferiore a quella calcolata dal software CheckExtractor™.

➡ Preparare la mastermix finale (costituita da PCR MasterMix di PapilloCheck®, polimerasi HotStarTaq® e uracil-N-glicosilasi) come indicato nella **tabella 3**.

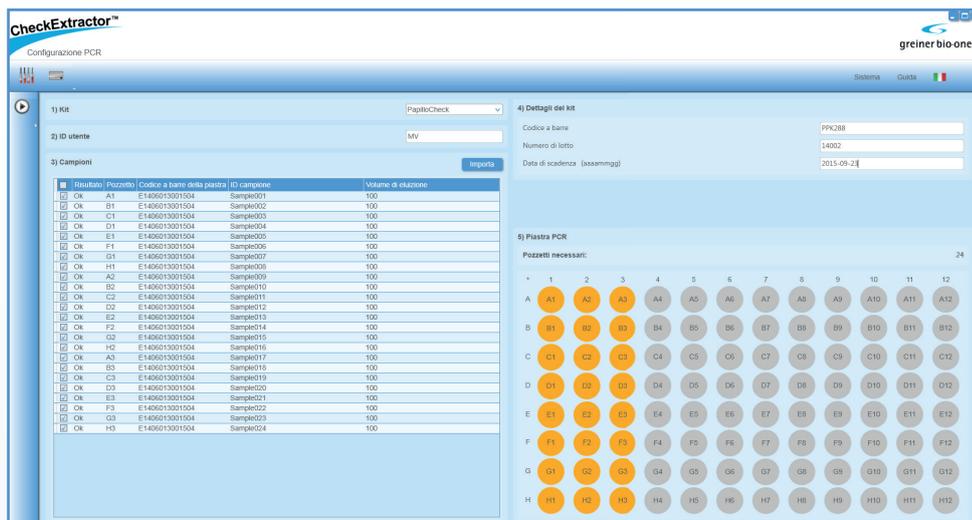
Tabella 3: preparazione della mastermix finale

Preparazione di una fiala, sufficiente per un massimo di 48 reazioni di PCR	
PCR MasterMix di PapilloCheck®	1148,4 µl
Polimerasi HotStarTaq® (5 U/µl)	11,6 µl
Uracil-N-glicosilasi (diluizione di 1:200, 0,005 U/µl)	58 µl
Volume totale della mastermix finale	1218 µl

► Nella schermata iniziale, selezionare “PCR” per avviare un metodo di preparazione della PCR.

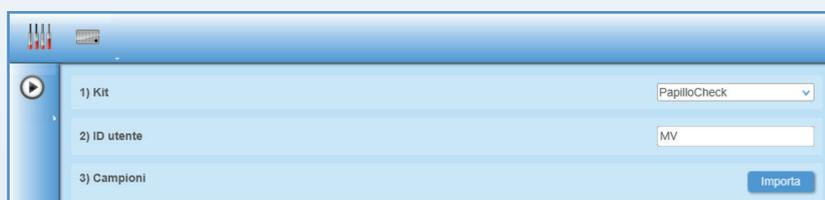


Compare una finestra in cui vengono chieste alcune informazioni di base.



► Completare le informazioni sulla procedura:

In “1) Kit” selezionare MasterMix PapilloCheck® dal menu a discesa e immettere il proprio ID utente nel campo “2) ID utente”. Nella sezione “3) Campioni”, premere il pulsante “Importa” per scegliere la piastra di eluizione da sottoporre a trattamento. Accertarsi di selezionare il file corretto verificandone il nome corrispondente al codice a barre e la data di emissione esatta. Qualora la piastra di eluizione sia già stata utilizzata per la preparazione di una PCR, occorre importare il file con l’ultima data di emissione.



Dopo l’importazione dei dati relativi a una specifica piastra di eluizione, viene visualizzato un elenco di campioni. Per impostazione predefinita, il software CheckExtractor™ segnala come attivo ciascun campione per cui l’estrazione del DNA è stata eseguita correttamente. La preparazione della PCR viene eseguita per tutti i campioni attivi. Qualora la PCR debba essere preparata per un numero inferiore di campioni, l’utente deve disattivarli opportunamente. Di nuovo, i materiali di consumo necessari, ovvero i puntali, e la mastermix finale sono calcolati dal software CheckExtractor™. Attendersi esattamente alle istruzioni del software durante la preparazione del supporto delle provette.

Nella sezione “4) Dettagli del kit”, posizionare il cursore sulla casella bianca relativa al “Codice a barre”. Scansionare il codice a barre del kit PapilloCheck® da utilizzare con lo scanner portatile fornito. Il software compila automaticamente la casella con il numero di riferimento del kit e le altre

due caselle con il numero di lotto e la data di scadenza del kit.

Sistema Guida 

4) Dettagli del kit

Codice a barre

Numero di lotto

Data di scadenza (aaaaammgg)



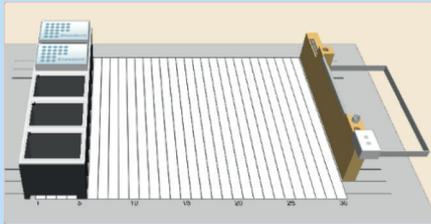
Il codice a barre del kit PapilloCheck® si trova nell'angolo in alto a sinistra del coperchio del kit stesso.

- ▶ Premere il pulsante di avvio nell'angolo in alto a sinistra della schermata per dare inizio alla procedura di preparazione della PCR.
- ▶ Comparire una schermata in cui è descritto il caricamento dei puntali.

CheckExtractor™ 

Caricamento dei puntali

Posizionare il supporto dei puntali sulla piattaforma di caricamento.
Ubicazione: -1
Nota: i puntali devono essere sufficienti per la procedura.



Posizione	Quantità	Descrizione
1-2	100	Puntali con filtro da 300 µl

Nota: i rack dei puntali devono essere caricati in tutte le posizioni (ma possono essere vuoti).

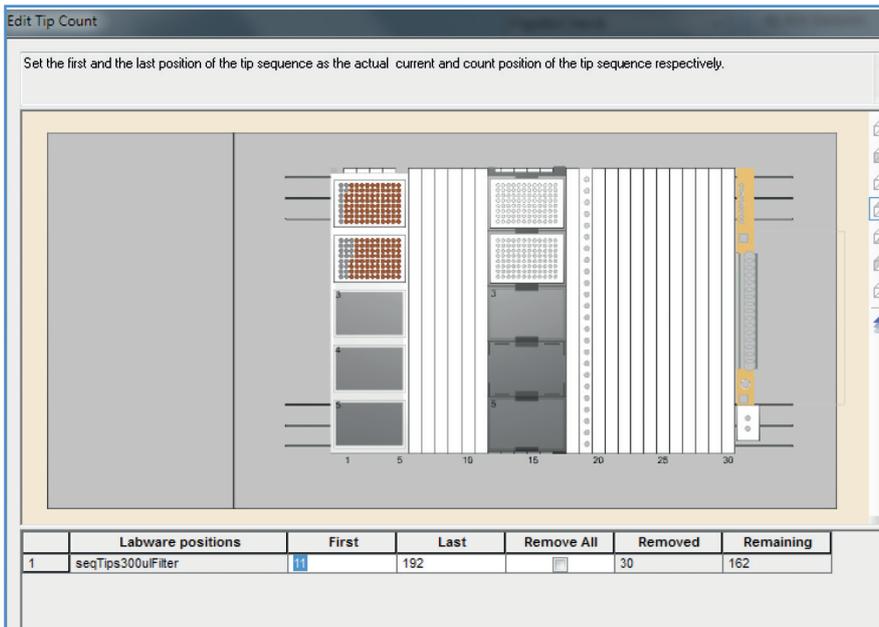
OK Annulla

- ▶ Collocare i puntali nel relativo supporto. Accertarsi di utilizzare le posizioni corrette.
- ▶ Porre i supporti dei puntali sulla piattaforma di caricamento partendo dalla scanalatura 1, come mostrato nell'immagine.
- ▶ Premere il pulsante "OK". CheckExtractor™ carica automaticamente i supporti.



Per garantire che il supporto venga caricato da CheckExtractor™, posizionarlo sulla piattaforma spingendolo con cautela nella scanalatura corretta finché si avverte una leggera resistenza meccanica. Da questa posizione il supporto viene caricato automaticamente dopo avere confermato con il pulsante "OK".

Compare lo strumento di modifica dei puntali.

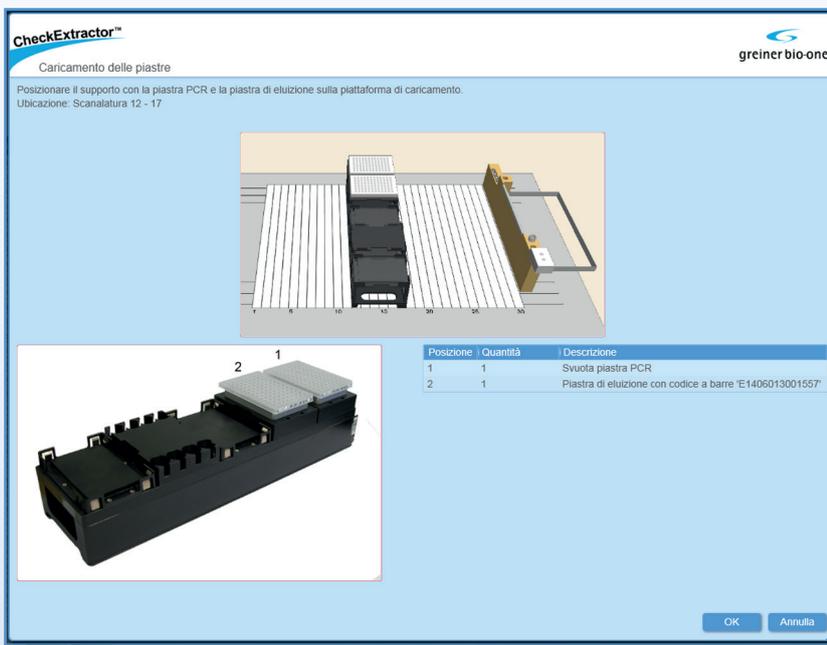


Verificare che le impostazioni dei puntali visualizzate siano corrette. I puntali ancora disponibili per la procedura sono di colore marrone, mentre le posizioni dei puntali vuote sono di colore grigio.

► Se le impostazioni visualizzate sono corrette, premere il pulsante “OK”.

Se invece è necessario modificare le impostazioni, consultare le istruzioni per l'uso di CheckExtractor™ per una spiegazione su come utilizzare lo strumento di modifica dei puntali.

Compare una schermata in cui è descritto il caricamento delle piastre.



► Collocare nel supporto delle piastre una piastra PCR vuota con codice a barre e la piastra di eluizione da sottoporre a trattamento. Posizionare la piastra PCR nella posizione 1 del supporto e la piastra di eluizione nella posizione 2. I codici a barre di entrambe le piastre devono essere rivolti verso destra, ovvero in direzione del lettore di codici a barre.

Al fine di ottimizzare il flusso di lavoro nel laboratorio ed evitare inutili cicli di congelamento e scongelamento, è raccomandabile eseguire il metodo di preparazione della PCR direttamente dopo il termine di una procedura di estrazione. In questo caso, la piastra di eluizione della precedente procedura di estrazione si trova ancora nella posizione 2 ed è necessario soltanto aggiungere la piastra PCR vuota.

Qualora per il metodo di preparazione della PCR venga utilizzata una piastra di eluizione “più vecchia”, ovvero precedentemente sigillata per la conservazione, prima di porla nel relativo supporto occorre scongelarla, sottoporla a breve spin-down servendosi di una centrifuga per piastre e rimuovere la sigillatura (vedere anche la sezione 8.2.4).

➡ Posizionare il supporto delle piastre nelle scanalature 12-17 della piattaforma di caricamento.

➡ Premere il pulsante “OK”. CheckExtractor™ carica automaticamente il supporto.



Per garantire che il supporto venga caricato da CheckExtractor™, posizionarlo sulla piattaforma spingendolo con cautela nella scanalatura corretta finché si avverte una leggera resistenza meccanica. Da questa posizione il supporto viene caricato automaticamente dopo avere confermato con il pulsante “OK”.



Il codice a barre della piastra di eluizione utilizzata deve corrispondere alla piastra selezionata precedentemente nella sezione “3) Campioni” nella schermata di definizione della procedura. In caso contrario, compare un messaggio di errore.

Compare una schermata in cui è descritto il caricamento della mastermix finale.

CheckExtractor™ greiner bio-one

Caricamento della provetta con master mix

Posizionare il supporto delle provette con la PCR master mix sulla piattaforma di caricamento.
Ubicazione: Scanalatura 19

Posizione	Quantità	Descrizione
23	1 provetta (1200 µl)	PapilloCheck
24	1 provetta (1200 µl)	PapilloCheck

OK Annulla

➡ Mescolare con cura la mastermix finale preparata agitando al vortex per 2 secondi e quindi procedendo allo spin-down oppure pipettando più volte.

➡ Porre nel supporto delle provette le fiale dotate di codice a barre per la preparazione della mastermix. Accertarsi che gli adattatori siano posizionati correttamente.

Per la preparazione della PCR di un massimo di 48 campioni, porre una fiala con codice a barre riempita con la mastermix finale preparata nell'adattatore, in corrispondenza della posizione 23 del supporto. Per la preparazione della PCR di un numero di campioni fino a 96, porre due fiale riempite nel supporto delle provette. Utilizzare adattatori nelle posizioni 23 e 24. Di nuovo, accertarsi che i codici a barre siano rivolti verso destra, ovvero in direzione del lettore.



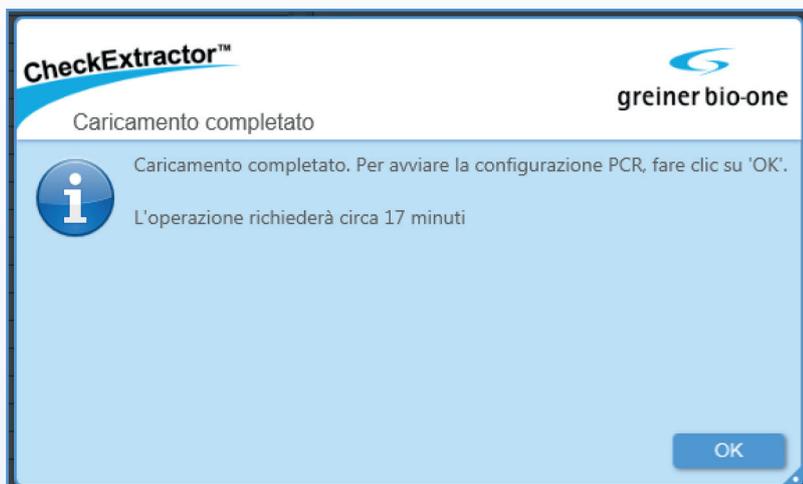
Qualora la soluzione venga mescolata passandola al vortex e sia pertanto utilizzato il tappo fornito con la fiala dotata di codice a barre, questo tappo deve essere rimosso prima di posizionare la fiala negli adattatori del supporto delle provette.

- ➡ Posizionare il supporto delle provette nella scanalatura 19 della piattaforma di caricamento.
- ➡ Premere il pulsante "OK". CheckExtractor™ carica automaticamente il supporto.

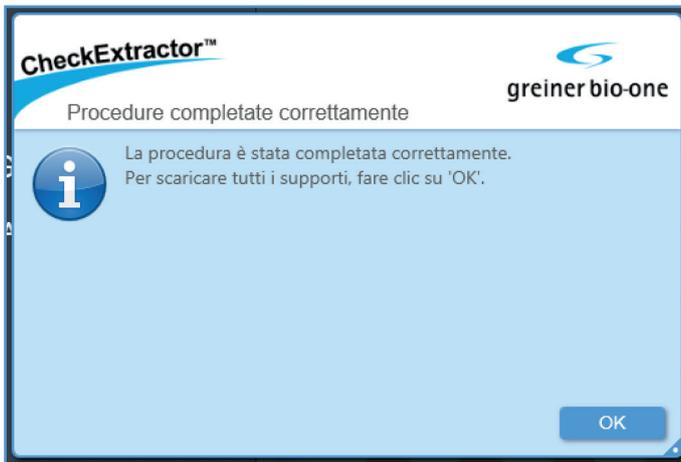


Per garantire che il supporto venga caricato da CheckExtractor™, posizionarlo sulla piattaforma spingendolo con cautela nella scanalatura corretta finché si avverte una leggera resistenza meccanica. Da questa posizione il supporto viene caricato automaticamente dopo avere confermato con il pulsante "OK".

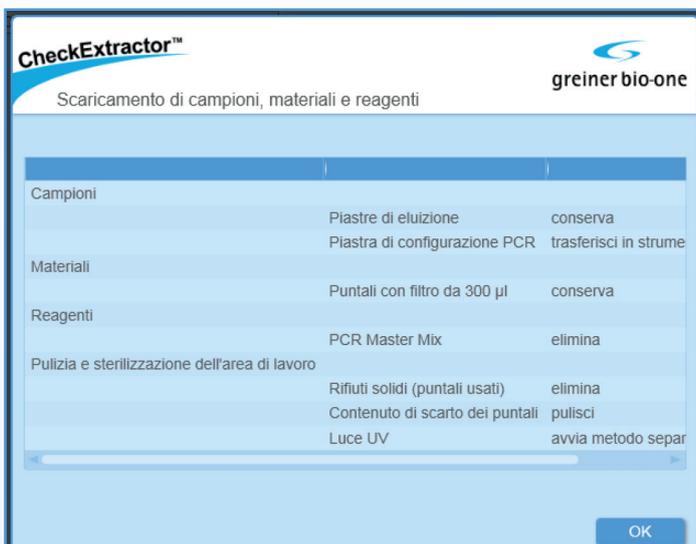
A questo punto il caricamento è terminato. CheckExtractor™ visualizza il tempo stimato per eseguire l'operazione e chiede di confermare l'avvio della procedura di preparazione della PCR.



- ➡ Fare clic su "OK" per avviare la procedura di preparazione della PCR.
- ➡ Una volta terminata correttamente la procedura, fare clic su "OK" per avviare l'operazione di scaricamento e la pulizia della piattaforma.



Dopo avere confermato, CheckExtractor™ scarica automaticamente tutti i supporti. Estrarli dalla piattaforma di caricamento. Seguire le altre istruzioni nell'ordine corretto, come mostrato sullo schermo, per scaricare in modo sicuro CheckExtractor™.



- ➡ Scaricare la piastra di eluizione dal relativo supporto. Maneggiare la piastra con cautela per evitare fuoriuscite.



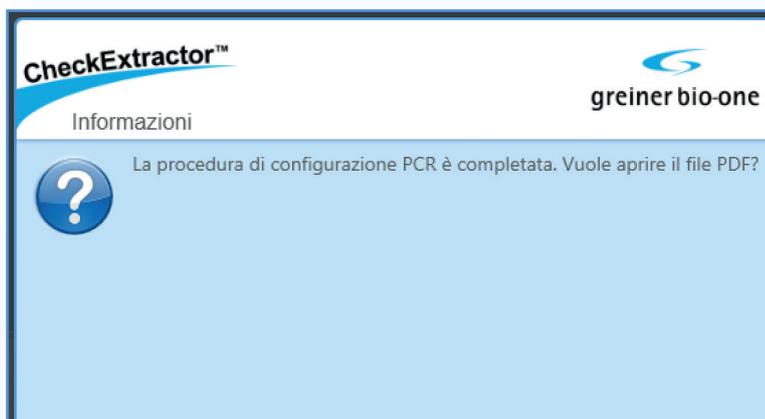
Qualora sia necessario conservare la piastra di eluizione per eseguire ulteriori analisi o ripetere analisi già fatte, sigillare tale piastra con un foglio adesivo (vedere la sezione 8.2.4) e mantenerla a -20°C.

- ➡ Scaricare la piastra PCR con la miscela di reazione dal relativo supporto. Maneggiare la piastra con cautela per evitare fuoriuscite. Sigillare la piastra PCR tramite sigillatura termica come descritto nella sezione 8.2.4. Trasferire la piastra sigillata nel ciclatore PCR e avviare la reazione di PCR con il programma descritto alla sezione 8.2.1 (tabella 2).



Al termine della PCR i prodotti di amplificazione devono essere immediatamente ibridati. In alternativa possono essere conservati al buio a -20°C per una settimana al massimo.

- ▶▶▶▶ Conservare il supporto dei puntali completo con all'interno ancora i puntali con filtro non utilizzati.
- ▶▶▶▶ Eliminare le fiale di mastermix con codice a barre
- ▶▶▶▶ Eliminare i puntali utilizzati nei rifiuti solidi di laboratorio.
- ▶▶▶▶ Pulire tutti i supporti ed eliminare i residui dei puntali con la soluzione detergente raccomandata (per maggiori informazioni consultare le istruzioni per l'uso di CheckExtractor™).
- ▶▶▶▶ Avviare il metodo a raggi UV per 30 minuti al fine di favorire ulteriormente la decontaminazione del DNA di CheckExtractor™.
- ▶▶▶▶ Fare clic su **"OK"** per confermare il completamento dell'operazione di pulizia della piattaforma. Da questo momento, è mostrato il percorso dove vengono salvati i file di report. Per ritornare alla schermata iniziale del programma, cliccare su **'OK'**.



La configurazione esatta dei campioni della piastra PCR risultante è contenuta nei file dei report. Essa è alla base del successivo trattamento PCR, comprendente ibridazione e lavaggio. Tenere presente che la disposizione potrebbe essere diversa da quella della piastra di eluizione utilizzata, poiché i campioni per cui l'estrazione non ha funzionato e i campioni disattivati vengono saltati. Pertanto i pozzetti nelle ultime posizioni della piastra PCR potrebbero risultare inutilizzati.

8.2.3.2 Procedura manuale di preparazione della PCR

Questo kit PapilloCheck® è destinato all'uso esclusivamente per lotti di 48 campioni. Pertanto, la preparazione della mastermix finale viene eseguita come descritto nella sezione precedente, utilizzando la fiala con codice a barre appositamente destinata alla preparazione della mastermix.



Contrariamente a quanto avviene nella procedura automatizzata di preparazione della PCR, non è indispensabile utilizzare la fiala con codice a barre per la preparazione della MasterMix finale. Di fatto, può essere impiegato qualsiasi tubo di reazione standard.

- ➡ Preparare la mastermix finale (costituita da PCR MasterMix PapilloCheck®, polimerasi HotStarTaq® e uracil-N-glicosilasi) come indicato nella tabella 3.

Per la preparazione manuale della miscela di reazione finale:

- ➡ Mescolare con cura la mastermix finale preparata agitando al vortex per 2 secondi e quindi procedendo allo spin-down oppure pipettando più volte.
- ➡ Aliquotare la mastermix finale pipettandone 21 µl per ciascuna reazione di PCR in un tubo di reazione a parete sottile da 0,2 ml di una strip per PCR oppure in un pozzetto di una piastra PCR.

Aggiungere il template di DNA in una zona di lavoro separata da quella in cui viene eseguita la preparazione della mastermix finale (vedere la sezione 7.2).

- ➡ Aggiungere 5 µl di DNA estratto a ciascun pozzetto o tubo di reazione e miscelare al vortex per 2 secondi procedendo quindi allo spin-down, oppure pipettare più volte. Il volume totale della reazione di PCR finale è 26 µl.



Si raccomanda di includere un controllo negativo per ogni lotto di mastermix preparato. Come controllo negativo è possibile impiegare il tampone di eluizione del DNA di un kit di estrazione adeguato o acqua di grado PCR.

- ➡ Chiudere le strip per PCR con strip di tappi adeguate e la piastra PCR tramite strip di tappi o sigillatura (vedere la sezione 8.2.4). Trasferire i tubi di reazione o la piastra PCR nel termociclatore e avviare la reazione di PCR con il programma descritto alla sezione 8.2.1 (tabella 2).



Al termine della PCR i prodotti di amplificazione devono essere immediatamente ibridati. In alternativa possono essere conservati al buio a -20°C per una settimana.

8.2.4 Sigillatura e conservazione delle piastre

8.2.4.1 Sigillatura e conservazione della piastra di eluizione

Ai fini della conservazione a -20°C, è necessario chiudere la piastra di eluizione una volta scaricata da CheckExtractor™.

- Chiedere la piastra di eluizione dopo che è stata rimossa dal dispositivo applicando un foglio adesivo Greiner Bio-One (Silver seal, 80.0 / 140 mm, RIF 676 090). Premerlo accuratamente sulla superficie della piastra. Conservare la piastra a -20°C.



Si raccomanda di utilizzare il foglio adesivo Greiner Bio-One (Silver seal, RIF 676 090) per la conservazione della piastra di eluizione, in quanto può essere facilmente rimosso dalla piastra qualora questa debba essere riutilizzata per una preparazione di PCR con CheckExtractor™. Tuttavia, per chiudere la piastra di eluizione è anche possibile utilizzare la procedura di sigillatura descritta per la piastra PCR nella sezione 8.2.4.2.

8.2.4.2 Sigillatura della piastra PCR

Dopo la procedura di scaricamento di CheckExtractor™ descritta nella sezione 8.2.3, è necessario sigillare la piastra PCR prima di trasferirla nel ciclatore PCR. A tale scopo, un foglio sigillante (Pierce Seal, RIF 865 804) viene saldato sulla piastra PCR tramite una termosigillatrice (modello: 4S3, RIF 865 802). Questa procedura è descritta nella **figura 5**.

- Accendere la termosigillatrice con l'interruttore posizionato sul retro dell'alloggiamento circa 5 minuti prima dell'uso, al fine di garantire il raggiungimento della necessaria temperatura di sigillatura di 170°C.
- Verificare la temperatura di sigillatura programmata e la durata della procedura di sigillatura premendo il tasto "**IMPOSTAZIONE**" (1 volta: viene visualizzata la temperatura di sigillatura; 2 volte: viene visualizzata la durata della procedura di sigillatura). Ai fini di una corretta sigillatura della piastra, occorre impostare una temperatura di sigillatura di 170°C e una durata della sigillatura di 2,0 secondi. Qualora uno o entrambi questi valori non siano corretti, regolarli utilizzando i tasti "▲" e "▼".



Per regolare la temperatura di sigillatura, premere il tasto di "**IMPOSTAZIONE**" nell'angolo in alto a sinistra della parte anteriore del dispositivo. Sul display lampeggia la temperatura di sigillatura impostata in quel momento. A questo punto è possibile impostare la temperatura richiesta con i tasti "▲" e "▼". Premendo nuovamente, viene confermata l'ultima temperatura di sigillatura visualizzata ed è mostrata la durata della procedura di sigillatura impostata in quel momento (anch'essa lampeggiante). Quindi anche la durata può essere impostata utilizzando i tasti "▲" e "▼". L'ulteriore pressione del tasto di "**IMPOSTAZIONE**" consente di confermare e salvare sul dispositivo la durata.

- Attendere finché il dispositivo non ha raggiunto i 170°C (la temperatura effettiva viene visualizzata costantemente). Oltre a tale visualizzazione, questa condizione è segnalata anche da un avviso acustico che viene emesso quando il dispositivo è pronto per l'uso.
- Aprire il dispositivo premendo il tasto di "**FUNZIONAMENTO**". Il vassoio con l'inserito per la piastra PCR si apre automaticamente.
- Rimuovere il telaio metallico e posizionare la piastra PCR sull'inserito del vassoio. Quindi porre il foglio sigillante (Pierce Seal, RIF 865 804) sulla piastra PCR. Accertarsi che la linea azzurra sia rivolta verso l'alto e che tutti i pozzetti risultino ben coperti. Posizionare il telaio metallico sulla parte superiore della piastra.

- ➡ Chiudere il dispositivo premendo di nuovo il tasto di **"FUNZIONAMENTO"**. Il vassoio si chiude automaticamente e inizia la procedura di sigillatura, al termine della quale il vassoio si riapre ancora in modo automatico. Rimuovere dapprima il telaio metallico, quindi la piastra PCR sigillata.



Dopo avere rimosso la piastra PCR, è possibile chiudere il dispositivo premendo il tasto di **"CHIUSURA"**. Per evitare incurvamenti del telaio metallico, si raccomanda di mantenerlo all'interno del dispositivo. Una volta chiuso, il dispositivo può essere spento in qualsiasi momento con l'interruttore di alimentazione sul retro dell'alloggiamento.

- ➡ Centrifugare brevemente la piastra PCR sigillata utilizzando una centrifuga per piastre (vedere la sezione 8.2.3.1) e trasferire immediatamente la piastra nel ciclatore PCR. Avviare la PCR utilizzando il programma **PapilloCheck®** (descritto nella sezione 8.2.1, tabella 2).

- ➡ Accendere la termosigillatrice 5 minuti prima dell'uso.
- ➡ Utilizzare una temperatura di sigillatura di 170°C e una durata di 2,0 secondi.
- ➡ Premere il tasto di **"FUNZIONAMENTO"** per aprire il dispositivo.



- ➡ Rimuovere il telaio metallico e posizionare la piastra PCR sull'insero del vassoio.
- ➡ Porre il foglio sigillante (Pierce Seal, RIF 865 804) sulla piastra PCR.
- ➡ Posizionare il telaio metallico sulla parte superiore della piastra.
- ➡ Premere il tasto di **"FUNZIONAMENTO"**.
- ➡ Rimuovere la piastra sigillata e premere il tasto di **"CHIUSURA"**.
- ➡ Spegnerla termosigillatrice.



Figura 5: procedura di sigillatura con una termosigillatrice

8.2.4.3 Richiusura della piastra PCR

Dopo avere eseguito l'ibridazione (vedere la sezione 8.3), la piastra PCR può essere nuovamente sigillata e conservata a -20°C.

- ➡ Chiudere la piastra PCR applicando un foglio adesivo Greiner Bio-One (Silver seal, RIF 676 090). Premerlo accuratamente sulla superficie della piastra. Conservare la piastra a -20°C.



Il foglio adesivo viene fissato direttamente sulla pellicola sigillante. Quando tale foglio viene rimosso, è possibile che la pellicola sottostante si stacchi parzialmente dalla piastra. Tuttavia, questa evenienza non rappresenta un problema per l'estrazione dei prodotti di PCR dalla piastra PCR.

8.3 Ibridazione e lavaggio

Le successive fasi della procedura PCR illustrate di seguito, ovvero ibridazione e lavaggio, vengono descritte soltanto per lotti di 48 campioni. Questo kit PapilloCheck® non è destinato all'uso per la gestione di lotti più piccoli. Pertanto, tutte le fasi di analisi sono descritte per il trattamento contemporaneo di quattro biochip PapilloCheck®.

8.3.1 Preparazione e disposizione

L'ibridazione deve avvenire a temperatura ambiente (20-25°C). Iniziare a preparare le fasi di ibridazione e lavaggio almeno 30 minuti prima di cominciare la procedura di ibridazione.

- ▶▶▶ Per disciogliere gli eventuali precipitati nei tamponi di ibridazione e di lavaggio, esporli a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti e mescolare bene prima dell'uso.

Conservando il kit PapilloCheck® a 4-8°C è possibile che nel tampone B si formi un precipitato di SDS. Attendere che la soluzione si stabilizzi a temperatura ambiente, quindi passare la provetta al vortex o agitare il flacone fino a disciogliere tutto il precipitato.

- ▶▶▶ Preparare la camera di ibridazione oCheck®: introdurre un asciugamano di carta fresco e umido e chiudere il coperchio per saturare l'atmosfera di umidità.

Per evitare l'evaporazione della piccola quantità di miscela di ibridazione usata sul biochip, è necessario che l'ibridazione avvenga in atmosfera satura di umidità. Greiner Bio-One offre una camera di ibridazione specifica per l'analisi PapilloCheck® (vedere la sezione 2).

- ▶▶▶ Incubare quattro biochip PapilloCheck® nella camera di ibridazione preparata a temperatura ambiente (20-25°C) per almeno 10 minuti.
- ▶▶▶ Preparare le soluzioni di lavaggio I, II e III rispettando le istruzioni indicate di seguito.

Preparazione delle soluzioni di lavaggio I, II e III:

- ▶▶▶ Preparare la miscela per le soluzioni di lavaggio I, II e III come descritto nella **tabella 4**.
- ▶▶▶ Aliquotare tre volumi identici di miscela per soluzione di lavaggio in tre vaschette oCheck® separate ed etichettarle come soluzioni di lavaggio I, II e III. Utilizzare la scala graduata incisa su ogni vaschetta oCheck® per immettere la quantità corretta di soluzione di lavaggio necessaria per 4 biochip.
- ▶▶▶ Preriscaldare la soluzione di lavaggio II a 50°C in un bagno termostatico a temperatura controllata per almeno 20 minuti prima dell'uso. Verificare che il livello di riempimento del bagno termostatico corrisponda al livello di riempimento della soluzione di lavaggio II.

Tabella 4: preparazione della miscela per soluzione di lavaggio

I volumi indicati in questa tabella sono sufficienti per le tre fasi di lavaggio (soluzione di lavaggio I, II e III) per quattro biochip PapilloCheck®.

Componenti	
Acqua distillata o deionizzata	560 ml
Tampone A PapilloCheck®	56 ml
Tampone B PapilloCheck®	7 ml
Volume totale	623 ml



Non riutilizzare le soluzioni di lavaggio: questa abitudine potrebbe portare ad accumulare prodotti di PCR che rischiano di interferire con i risultati di PapilloCheck®. Usare soluzioni di lavaggio fresche per ogni saggio.

La miscela per soluzione di lavaggio preparata può essere conservata per una settimana al massimo a temperatura ambiente. Controllare se la miscela contiene precipitato di SDS. In caso affermativo, riscaldare la miscela fino a disciogliere il precipitato e riportare a temperatura ambiente. Quindi preparare l'ibridazione.

8.3.2 Ibridazione

L'ibridazione deve avvenire a temperatura ambiente (20-25°C). Le principali fasi di lavoro per ibridare i prodotti della reazione di PCR PapilloCheck® sul biochip PapilloCheck® sono illustrate nella **figura 6**.

▀▀▀ Miscelare i prodotti di PCR prima dell'uso. Sottoporre a breve spin-down. Se è stata utilizzata una piastra PCR sigillata, servirsi di una centrifuga per piastre adeguata.

Se i prodotti di PCR sono stati conservati a -20°C fino all'ibridazione, scongelarli prima di miscelare, quindi procedere come descritto.

▀▀▀ Passare il tampone di ibridazione al vortex prima dell'uso. Sottoporre a breve spin-down.

▀▀▀ Trasferire 30 µl del tampone di ibridazione PapilloCheck® in un tubo di reazione fresco di una strip per PCR da 8. Qualora risulti più pratico, è anche possibile utilizzare un pozzetto fresco di una piastra PCR.

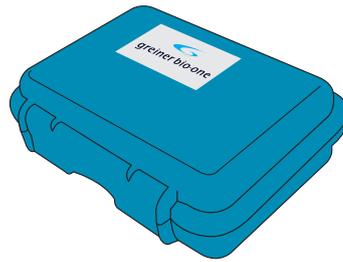
▀▀▀ Aggiungere 5 µl dei prodotti di PCR al tampone di ibridazione. Se per la preparazione della PCR è stato utilizzato CheckExtractor™ di Greiner Bio-One, i prodotti di PCR si trovano in una piastra PCR sigillata. Il foglio sigillante può essere perforato utilizzando un puntale di pipetta. Per richiudere la piastra PCR consultare la sezione 8.2.4.3.

▀▀▀ Sottoporre a breve spin-down.

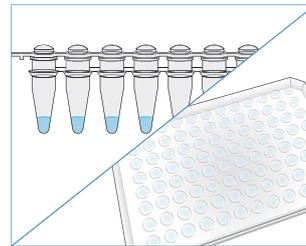
▀▀▀ Trasferire **25 µl** di miscela di ibridazione in ciascun pozzetto del biochip usando sei canali di una pipetta multicanale. Evitare la formazione di bolle d'aria.

Al fine di ottenere il tempo di ibridazione corretto, è indispensabile trattare sei campioni in parallelo utilizzando una pipetta a 8 canali (osservare la **figura 6**). Questo aumenta l'efficienza di manipolazione e la velocità, riducendo il rischio di evaporazione.

- ▢▢▢▢ Preparare la camera di ibridazione saturando l'atmosfera di umidità.
- ▢▢▢▢ Incubare i biochip PapilloCheck® nella camera di ibridazione a temperatura ambiente (20-25°C) (vedere la sezione 8.3.1).



- ▢▢▢▢ Miscelare 30 µl del tampone di ibridazione PapilloCheck® in un tubo di reazione da 0,2 ml di una strip per PCR oppure in un pozzetto di una piastra PCR con 5 µl del prodotto di PCR. Mescolare con cura.



- ▢▢▢▢ Trasferire **25 µl** di miscela di ibridazione in ciascun pozzetto del biochip PapilloCheck® usando una pipetta multicanale.



- ▢▢▢▢ Chiudere la camera di ibridazione e incubare i biochip PapilloCheck® per **15 minuti** esatti a temperatura ambiente (20-25°C).



Figura 6: fasi della procedura di ibridazione

8.3.3 Lavaggio ed essiccamento

La speciale apparecchiatura fornita da Greiner Bio-One permette di lavare contemporaneamente quattro biochip PapilloCheck® (consultare la sezione 2). Per il trattamento dei biochip PapilloCheck® occorrono anche tre vaschette di lavaggio oCheck® e una maniglia per il portavetrini magnetico della camera di ibridazione.

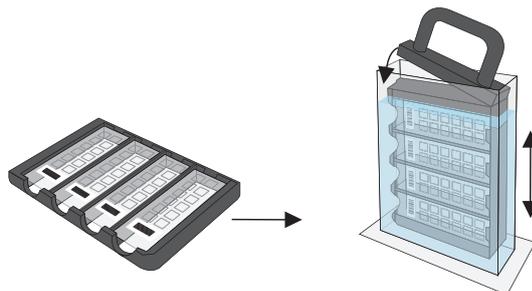
La **figura 7** illustra le diverse fasi di lavoro.

- ▶▶▶ Rimuovere con cautela il portavetrini magnetico che contiene i vetrini ibridati dalla camera di ibridazione.
- ▶▶▶ Lasciar scivolare il portavetrini direttamente nella vaschetta di lavaggio oCheck® con la soluzione di lavaggio I. Controllare che il lato magnetico sia rivolto verso l'alto.
- ▶▶▶ Fissare la maniglia oCheck® al portavetrini e iniziare la prima delle tre fasi di lavaggio.
- ▶▶▶ Lavare i biochip a **temperatura ambiente (20-25°C)** nella soluzione di **lavaggio I** muovendoli su e giù per **10 secondi**. Gli array devono rimanere sempre immersi nella soluzione.
- ▶▶▶ Lavare i biochip a **50°C** nella **soluzione di lavaggio II** muovendo il portavetrini su e giù per **60 secondi**.
- ▶▶▶ Lavare i biochip a **temperatura ambiente (20-25°C)** nella **soluzione di lavaggio III** muovendoli su e giù per **10 secondi**.
- ▶▶▶ Eliminare **immediatamente** qualsiasi traccia di liquido dalla superficie dei biochip mediante centrifugazione. Se si utilizza una microcentrifuga specifica per microarray centrifugare per 1 minuto. Qualora si utilizzi una centrifuga per provette da 50 ml, collocare ogni biochip PapilloCheck® lavato in una provetta da 50 ml e centrifugare a **temperatura ambiente** per **3 minuti a 500 g**.

I biochip PapilloCheck® sono pronti per l'analisi, cui devono essere sottoposti immediatamente. Per pulire le vaschette oCheck® risciacquare più volte con acqua dopo aver completato ogni procedura di lavaggio ed essiccamento.

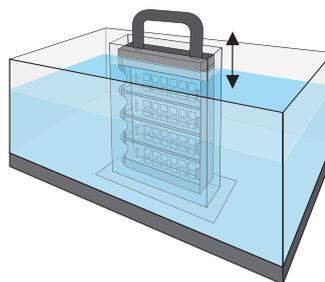
Prima fase di lavaggio

- Rimuovere con cautela il portavetrini magnetico dalla camera di ibridazione.
- Far scivolare rapidamente il portavetrini nella vaschetta di lavaggio oCheck® con la soluzione di lavaggio I.
- Fissare la maniglia oCheck®.
- Lavare i biochip PapilloCheck® nella soluzione di lavaggio I a **temperatura ambiente** muovendo il portavetrini su e giù per **10 secondi**.



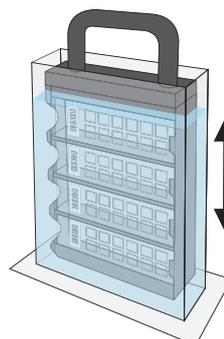
Seconda fase di lavaggio

- Lavare i biochip PapilloCheck® nella soluzione di lavaggio II in bagno termostatico a **50°C** muovendo il portavetrini su e giù per **60 secondi**.



Terza fase di lavaggio

- Lavare i biochip PapilloCheck® nella soluzione III a **temperatura ambiente** muovendo il portavetrini su e giù per **10 secondi**.



Essiccamento

- Eliminare immediatamente qualsiasi traccia di liquido dalla superficie dei biochip PapilloCheck® mediante centrifugazione.

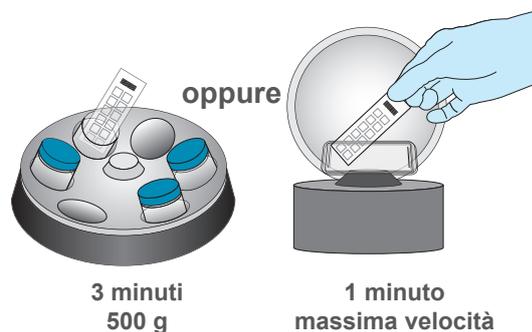


Figura 7: fasi della procedura di lavaggio

Fasi di lavaggio e procedura di essiccamento precedenti l'analisi dei biochip PapilloCheck® con CheckScanner™ e il software CheckReport™.

8.4 Scansione e valutazione del biochip PapilloCheck®

Collocare i biochip PapilloCheck® in CheckScanner™ e procedere alla scansione come descritto dettagliatamente nel manuale d'uso del software CheckReport™.

Per maggiori informazioni sui requisiti di sistema e sull'installazione di CheckScanner™ e del software CheckReport™, consultare le istruzioni per l'uso di CheckScanner™ e del software CheckReport™.

Prima di analizzare i dati con il software CheckReport™, controllare che la versione installata sul computer corrisponda a quella indicata sul kit PapilloCheck® utilizzato. In caso contrario aggiornare CheckReport™. La versione aggiornata del software è disponibile sul sito web di Greiner Bio-One: www.gbo.com/bioscience/biochips_download

9. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Se durante la scansione del biochip viene visualizzato uno dei messaggi di errore seguenti o se l'analisi PapilloCheck® non riesce a causa di specifici controlli sul biochip, procedere come segue. Per qualsiasi domanda o difficoltà nell'utilizzare PapilloCheck® rivolgersi al distributore locale Greiner Bio-One. Per la risoluzione di problemi relativi ad altre fasi di analisi, ad esempio l'estrazione del DNA, consultare le istruzioni per l'uso pertinenti.

PROBLEMA e causa	Commenti e suggerimenti
<p>MESSAGGIO DI ERRORE "IMPOSSIBILE LEGGERE IL CODICE A BARRE"</p> <p>Codice a barre danneggiato</p> <p>Il biochip non è stato caricato correttamente</p>	<p>Verificare se il codice a barre è danneggiato. Inserire il codice manualmente quando viene visualizzata la finestra opportuna.</p> <p>Controllare l'orientamento del biochip ed eseguire la scansione con l'orientamento corretto.</p>
<p>MESSAGGIO DI ERRORE "SPOT MANCANTI", CONTROLLO STAMPA NON RIUSCITO O CONTROLLO ORIENTAMENTO NON RIUSCITO</p> <p>Il biochip è impolverato</p> <p>Formazione di bolle d'aria durante il trasferimento del liquido sul biochip</p>	<p>Ripetere l'ibridazione dei prodotti di PCR su un altro biochip.</p> <p>Ripetere l'ibridazione dei prodotti di PCR su un altro biochip. Pipettare con cura, in modo da evitare la formazione di bolle d'aria.</p>
<p>CONTROLLO IBRIDAZIONE NON RIUSCITO</p> <p>Temperatura della soluzione di lavaggio II non corretta</p> <p>Temperatura del bagno termostatico non corretta</p> <p>Errore nella preparazione della miscela di ibridazione</p>	<p>La seconda fase di lavaggio deve essere eseguita a una temperatura di 50°C. Accertarsi che la soluzione di lavaggio II venga riscaldata fino a raggiungere 50°C.</p> <p>La seconda fase di lavaggio deve essere eseguita a una temperatura di 50°C. Verificare la temperatura del bagno termostatico. Accertarsi che il bagno termostatico sia impostato a una temperatura di 50°C. Se necessario, controllare la temperatura con un termometro.</p> <p>Ripetere la preparazione della miscela di ibridazione usando i volumi corretti e ibridare i prodotti di PCR su un altro biochip.</p>
<p>CONTROLLO PCR NON RIUSCITO</p> <p>La DNA polimerasi HotStarTaq® non è stata aggiunta alla MasterMix</p> <p>La DNA polimerasi HotStarTaq® aggiunta alla MasterMix non funziona correttamente</p> <p>La uracil-N-glicosilasi aggiunta alla MasterMix non è diluita</p> <p>Miscela di reazione non mescolata a sufficienza</p> <p>Il campione contiene inibitori della PCR</p>	<p>Ripetere l'analisi PapilloCheck® iniziando con la preparazione della reazione di PCR.</p> <p>Ripetere l'analisi PapilloCheck® iniziando con la preparazione della reazione di PCR.</p> <p>Ripetere l'analisi PapilloCheck® iniziando con la preparazione della reazione di PCR.</p> <p>Ripetere l'analisi PapilloCheck® iniziando con la reazione di PCR. Mescolare bene la miscela di reazione.</p> <p>Ripetere l'estrazione del DNA e l'analisi PapilloCheck®.</p>

PROBLEMA e causa	Commenti e suggerimenti
L'ibridazione è avvenuta senza aggiungere il prodotto di PCR	Ripetere l'ibridazione.
Miscela di ibridazione non mescolata a sufficienza	Ripetere l'ibridazione.
Problemi con il termociclatore	Controllare le prestazioni del termociclatore e la sua corretta programmazione (fasi di PCR, rampa di riscaldamento, volume). Utilizzare esclusivamente termociclatori validati in combinazione con PapilloCheck®.
CONTROLLO CAMPIONE NON RIUSCITO	
Il DNA del campione non è stato aggiunto alla reazione di PCR	Ripetere l'analisi PapilloCheck® iniziando con la reazione di PCR.
Preparazione del DNA non riuscita	Ripetere l'estrazione del DNA
Materiale campione insufficiente	Prelievo del campione non riuscito. Campione molto diluito. Concentrare il campione secondo quanto indicato alla sezione 9.1 e ripetere l'estrazione del DNA oppure prelevare un nuovo campione.
I CONTROLLI PCR E/O CAMPIONE SONO RIUSCITI, MA VISUALIZZANO UN VALORE SNR PARI A 0	Se il software CheckReport™ rileva almeno un tipo di HPV nel campione con un segnale superiore a una soglia predeterminata, il risultato viene considerato valido. Il controllo campione e/o PCR può presentare segnali di fluorescenza bassi o assenti a causa della competizione durante la PCR.

10. ASSISTENZA TECNICA

Greiner Bio-One dispone di un dipartimento di assistenza tecnica dotato di personale esperto con approfondite competenze pratiche e teoriche in biologia molecolare e nei prodotti oCheck®. Per qualsiasi domanda o difficoltà riguardante i prodotti oCheck® rivolgersi al distributore locale Greiner Bio-One.

11. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI DI PAPILOCHECK®

11.1 Prestazioni analitiche di PapilloCheck®

11.1.1 Sensibilità analitica

Il limite di rilevazione (LOD) è stato definito utilizzando plasmidi di riferimento per ogni tipo di HPV rilevabile contenenti la regione E1 ricercata da PapilloCheck®. I limiti sono indicati nella **tabella 5**.

Tabella 5: limiti di rilevazione dei tipi di HPV individuabili

Genotipo HPV	Copie / reazione	pg/ml**
HPV 6	30*	0,052
HPV 11	150*	0,26
HPV 16	50*	0,086
HPV 18	300*	0,516
HPV 31	300*	0,522
HPV 33	300*	0,519
HPV 35	750*	1,29
HPV 39	30*	0,052
HPV 40	30*	0,052
HPV 42	30*	0,052
HPV 43	100*	0,175
HPV 44	30*	0,052
HPV 45	50*	0,087
HPV 51	30*	0,051
HPV 52	100*	0,174
HPV 53	30*	0,052
HPV 56	30*	0,052
HPV 58	150*	0,255
HPV 59	50*	0,087
HPV 66	100*	0,171
HPV 68	30*	0,052
HPV 70	30*	0,052
HPV 73	200*	0,338
HPV 82	30*	0,052

* La concentrazione validata di ciascun plasmide di riferimento HPV è stata preparata con due serie di diluizioni indipendenti e misurata in tre ripetizioni della concentrazione testata (ovvero un totale di sei ripetizioni per concentrazione). Inoltre, ogni test conteneva 10 ng di DNA umano. In caso di variazione rispetto ai dati validati, le concentrazioni del plasmide specifico sono state aumentate o ridotte e nuovamente testate (sei ripetizioni da due serie di diluizioni indipendenti). Il limite di rilevazione corrisponde al valore di concentrazione più basso in cui le sei ripetizioni erano positive.

** Analisi diretta, senza considerare la preparazione del DNA. La quantità si riferisce al DNA di HPV contenuto nel plasmide.

11.1.2 Specificità analitica – tipi di HPV

I plasmidi di riferimento dei tipi di HPV elencati sono stati testati con $2,12 \times 10^6$ copie/reazione di PCR.

HPV 6b, HPV 11, HPV 13, HPV 16, HPV 18, HPV 26, HPV 30, HPV 31, HPV 33, HPV 34, HPV 35, HPV 39, HPV 40, HPV 42, HPV 43, HPV 44, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 53, HPV 54, HPV 55, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 61, HPV 66, HPV 67, HPV 68, HPV 69, HPV 70, HPV 71, HPV 73, HPV 74, HPV 81, HPV 82, HPV 84, HPV 85, HPV 91.

Sono state individuate le seguenti ibridazioni incrociate:

HPV 55 dà un segnale sulla sonda di HPV 44. Di conseguenza, il software CheckReport™ visualizza un risultato combinato HPV 44/HPV 55.

HPV 13 può avere una reazione incrociata con la sonda di HPV 11, ma non determina un falso positivo in quanto l'HPV 13 non è presente nei campioni cervicali.

11.1.3 Specificità analitica – organismi diversi dall'HPV

I seguenti organismi diversi dall'HPV sono stati testati con PapilloCheck® (5-10 ng di DNA genomico). Non sono stati rilevati segnali positivi.

Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffii, Actinobacillus actinomycetemcomitans Serovar c, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces viscosus, Bacillus subtilis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Campylobacter concisus, Campylobacter gracilis, Campylobacter rectus, Candida albicans, Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena, Citrobacter amalonaticus, Citrobacter freundii, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Citrobacter koseri, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Eikenella corrodens, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Enterococcus durans, Enterococcus faecali, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Eubacterium nodatum, Fusobacterium nucleatum, Gardnerella vaginalis, Hafnia alvei, Kingella denitrificans, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus casei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus vaginalis, Mogibacterium timidum, Morganella morgani, Mycoplasma hominis, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma orale, Mycoplasma pirum, Mycoplasma salivarium, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria elongata, Neisseria gonorrhoeae, Peptoniphilus asaccharolyticus, Peptostreptococcus anaerobius, Peptostreptococcus micros, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Proteus hauseri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus ssp. aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus saprophyticus, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus agalactiae, Streptococcus constellatus, Streptococcus criceti, Streptococcus cristatus, Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis, Streptococcus sobrinus, Tannerella forsythensis (in precedenza: Bacteroides forsythus), Treponema denticola, Ureaplasma urealyticum, Veillonella parvula.

11.2 Ripetibilità

Per valutare la ripetibilità sono stati analizzati con PapilloCheck® cinque campioni, ciascuno contenente tre diversi template di riferimento di HPV e DNA genomico umano. Il numero di copie dei diversi bersagli HPV presenti nel campione è stato variato, così come il substrato di DNA umano (vedere la **tabella 6**). Ciascun campione è stato analizzato con PapilloCheck® in cinque replicazioni indipendenti. Le replicazioni sono state testate dal medesimo tecnico di laboratorio entro tre giorni.

Tabella 6: composizione dei campioni per il test di ripetibilità

ID campione	Tipo di HPV	Quantità di template di DNA	Limite di rilevazione x numero di volte
Campione 1	HPV 16	180 copie	3
	HPV 18	1.500 copie	10
	HPV 31	1.400 copie	30
	DNA genomico umano	1 ng	
Campione 2	HPV 16	180 copie	3
	HPV 18	1.500 copie	10
	HPV 31	1.400 copie	30
	DNA genomico umano	5 ng	
Campione 3	HPV 16	1.800 copie	30
	HPV 18	450 copie	3
	HPV 45	300 copie	10
	DNA genomico umano	5 ng	
Campione 4	HPV 16	10.000 copie	-
	HPV 18	5.000 copie	-
	HPV 45	20.000 copie	-
	DNA genomico umano	2,5 ng	-
Campione 5	HPV 18	4.500 copie	30
	HPV 31	500 copie	10
	HPV 45	90 copie	3
	DNA genomico umano	2,5 ng	

Tutti i cinque campioni, in ciascuna analisi, hanno consentito di rilevare i tre tipi di HPV corretti, con risultati negativi per i tipi non inclusi. Pertanto è possibile affermare che 75 risultati su 75 (5 campioni x 5 replicazioni x 4 diversi tipi di template di HPV usati) erano corretti.

11.3 Riproducibilità

La riproducibilità del kit PapilloCheck® è stata determinata usando 22 campioni clinici (vedere la **tabella 7**) con HPV in concentrazioni vicine al limite di rilevazione. La determinazione è stata condotta applicando lo stesso metodo, con materiale campione identico, ad opera di più tecnici, in laboratori differenti, con strumenti diversi. I risultati sono stati giudicati concordanti per i campioni positivi quando sono stati rilevati tipi di HPV identici in infezioni singole o doppie o quando due o tre tipi di HPV identici sono stati individuati in infezioni multiple con presenza di tre o quattro tipi rispettivamente.

Tabella 7: risultati del test di riproducibilità

Numero campione	Risultato del laboratorio 1	Risultato del laboratorio 2	Concordanza
1	HPV 33	HPV 33	+
2	HPV 35	HPV 35	+
3	negativo	negativo	+
4	HPV 45	HPV 45	+
5	HPV 51, HPV 52	HPV 51, HPV 52	+
6	HPV 51, HPV 56	HPV 51, HPV 56	+
7	HPV 16, HPV 39, HPV 68	HPV 16, HPV 39, HPV 68, HPV 82	+
8	HPV 39, HPV 68	HPV 39, HPV 68	+
9	HPV 16	HPV 16	+
10	negativo	negativo	+
11	HPV 56, HPV 44/55	HPV 56, HPV 44/55	+
12	negativo	negativo	+
13	HPV 11, HPV 18, HPV 56	HPV 11, HPV 18, HPV 56	+
14	HPV 51, HPV 44/55	HPV 51, HPV 44/55	+
15	HPV 53, HPV 58, HPV 43	HPV 53, HPV 58, HPV 68, HPV 43	+
16	negativo	negativo	+
17	HPV 16	HPV 16	+
18	HPV 16	HPV 16	+
19	HPV 45	HPV 45	+
20	HPV 16	HPV 16	+
21	HPV 53, HPV 58	HPV 53, HPV 58	+
22	HPV31	HPV 31	+

I risultati erano concordanti per tutti i campioni clinici. I segnali dei tipi aggiuntivi rilevati dal Laboratorio 2 per campioni con infezione multipla 7 (HPV 82) e 15 (HPV 68) erano di poco superiori alla soglia definita e i risultati discordanti sono stati ritenuti trascurabili.

11.4 Efficacia

Per valutare l'efficacia del test PapilloCheck® sono state considerate le variazioni dei parametri seguenti:

- Temperatura di ibridazione
- Tempo di ibridazione
- Temperatura di lavaggio
- Tempo di lavaggio

Tutti i test sono stati condotti in replicazioni di 3 con templati ad elevata concentrazione (plasmide di riferimento con 1 ng di HPV o circa 200×10^6 copie per campione). Gli intervalli dei valori dei parametri che consentono un'efficace rilevazione dell'HPV con il kit PapilloCheck® sono riportati nella **tabella 8**.

Tabella 8: efficacia di PapilloCheck®

Parametro	Intervallo
Temperatura di ibridazione	20-25°C
Tempo di ibridazione	13-17 minuti
Temperatura di lavaggio	48-52°C
Tempo di lavaggio	1a fase di lavaggio 10-15 secondi
	2a fase di lavaggio 60-75 secondi
	3a fase di lavaggio 10-15 secondi

11.5 Efficienza clinica di PapilloCheck®

Per determinare l'efficienza clinica del saggio PapilloCheck® in termini di sensibilità e specificità è stato condotto uno studio comparativo impiegando i test PapilloCheck® e GP5+/6+-PCR EIA⁷. Lo studio ha analizzato campioni di 1.437 donne con riscontro citologico normale (gruppo di controllo) di età superiore a 40 anni (età mediana: 49 anni, intervallo: da 40 a 60 anni) e di 192 donne (età mediana: 34 anni, intervallo: da 30 a 60 anni) con lesioni CIN3+ istologicamente confermate (gruppo dei casi). Tutti i campioni utilizzati nello studio erano stati inizialmente prelevati da donne facenti parte del gruppo di intervento dello studio di implementazione controllato randomizzato e basato sull'intera popolazione POBASCAM⁸.

Dopo aver ristretto l'analisi di PapilloCheck® ai 14 tipi di hrHPV individuabili con il GP5+/6+-PCR-EIA, PapilloCheck® ha dimostrato una sensibilità clinica per ≥ CIN3 del 95,8% (184/192; 95% CI 92,8-98,8) e una specificità clinica per ≥ CIN2 del 96,7% (95% CI 95,7-97,7). A confronto, per GP5+/6+-PCR-EIA queste cifre erano rispettivamente 96,4% (185/192; 95% CI: 93,9-98,9) e 97,7 % (95% CI: 96,9-98,5) (vedere le **tabelle 9 e 10**).

Tabella 9: confronto dei risultati di PapilloCheck® (14 tipi di hrHPV) e GP5+/6+ PCR-EIA stratificati per controlli e casi.

	PapilloCheck® (14 tipi di hrHPV)	GP5+/6+-PCR/EIA		Totale
		-	+	
Controlli	-	1.386 (96,5 %)	4 (0,3 %)	1.390 (96,7 %)
	+	18 (1,3 %)	29 (2,0 %)	47 (3,3 %)
	totale	1.404 (97,7 %)	36 (2,3 %)	1.437
Casi	-	4 (2,1 %)	4 (2,1 %)	8 (4,2 %)
	+	3 (1,6 %)	181 (94,3 %)	184 (95,8 %)
	totale	7 (3,6 %)	185 (96,4 %)	192

Tabella 10: sensibilità e specificità clinica di PapilloCheck® e GP5+/6+-PCR-EIA (risultati per uno o più dei 14 tipi di hrHPV HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 o 68).

14 hrHPV	PapilloCheck®	GP5+/6+
Sensibilità clinica per ≥ CIN3	95,8 %	96,4 %
Sensibilità clinica per ≥ CIN2	96,7 %	97,7 %

⁷ Comparison of the clinical performance of PapilloCheck® human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. Hesselink AT, Heideman DA, Berkhof J, Topal F, Pol RP, Meijer CJ, Snijders PJ. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):797-801. Epub 2009 Dec 30.

⁸ Bulkman, N. W., L. Rozendaal, P. J. Snijders, F. J. Voorhorst, A. J. Boeke, G. R. Zandwijken, F. J. van Kemenade, R. H. Verheijen, K. Groningen, M. E. Boon, H. J. Keuning, M. van Ballegooijen, A. J. van den Brule, and C. J. Meijer. 2004. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. Int. J. Cancer 110:94–101.

Per valutare la riproducibilità del saggio PapilloCheck® con campioni clinici, nel 2012 è stato condotto uno studio nei Paesi Bassi e in Germania. In esso sono stati utilizzati campioni cervicali ottenuti da una coorte di 10.000 donne che hanno preso parte a un regolare screening citologico cervicale nella provincia di Utrecht nei Paesi Bassi. Utilizzando una serie determinata di 550 campioni pretestati, PapilloCheck® ha mostrato una riproducibilità e un accordo intra-laboratorio pari rispettivamente a 97,6% e 94%. Le serie di dati relativi alla valutazione della riproducibilità sono riepilogati nelle **tabelle 11 e 12**.

Tabella 11: riproducibilità intra-laboratorio

	PapilloCheck® tempo 1 pos	PapilloCheck® tempo 1 neg
PapilloCheck® tempo 2 pos	147	6
PapilloCheck® tempo 2 neg	7	390

Risultati:

Riproducibilità [%]: 97,3

Limite di confidenza inferiore [%] = 96,3

Kappa = 0,941

Tabella 12: accordo intra-laboratorio

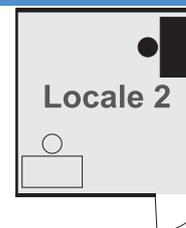
	PapilloCheck® tempo 1 pos	PapilloCheck® tempo 1 neg
PapilloCheck® tempo 2 pos	123	2
PapilloCheck® tempo 2 neg	31	394

Risultati:

Riproducibilità [%]: 94

Limite di confidenza inferiore [%] = 92,1

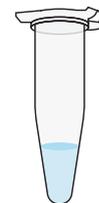
Kappa = 0,842



12. PROTOCOLLO BREVE DI PAPILOCHECK®

12.1 Locale 2: preparazione della mastermix finale

- Diluire l'uracil-N-glicosilasi in un rapporto di **1:200** in acqua di grado PCR.
- Mescolare con cura la diluizione di UNG.



- Preparare la mastermix utilizzando la fiala con codice a barre appositamente destinata alla preparazione della mastermix.

Preparazione di una fiala, sufficiente per un massimo di 48 reazioni di PCR

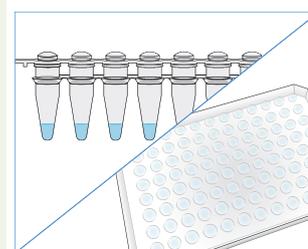
PCR MasterMix di PapilloCheck®	1148,4 µl
Polimerasi HotStarTaq® (5 U/µl)	11,6 µl
Uracil-N-glicosilasi (diluizione di 1:200, 0,005 U/µl)	58 µl
Volume totale della mastermix finale	1218 µl

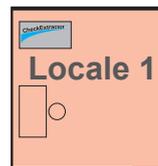


- Mescolare con cura la mastermix finale.
- Preparare una o due fiale in funzione della quantità di campioni da analizzare o calcolare con il software CheckExtractor™ rispettivamente.

OPZIONALE: preparazione manuale della PCR

- Aliquotare la mastermix finale aggiungendone **21 µl** per ciascuna reazione di PCR in un tubo di reazione da 0,2 ml di una strip per PCR oppure in un pozzetto di una piastra PCR.
- Continuare seguendo le istruzioni relative all'aggiunta manuale del template di DNA (vedere la sezione 12.2.2).





12.2 Preparazione della PCR

12.2.1 Locale 1: preparazione automatizzata della PCR con CheckExtractor™

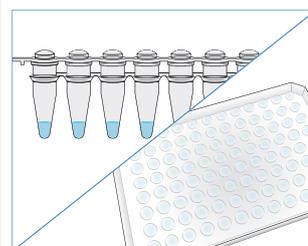
<ul style="list-style-type: none"> ▣▣▣▣ Avviare il metodo di preparazione della PCR. ▣▣▣▣ Completare le informazioni sulla procedura. ▣▣▣▣ Caricare il supporto dei puntali con la quantità sufficiente. ▣▣▣▣ Caricare il supporto delle piastre con la piastra di eluizione e la piastra PCR vuota. 	
<ul style="list-style-type: none"> ▣▣▣▣ Caricare la fiala della mastermix con il codice a barre preparata sul supporto delle provette. ▣▣▣▣ Caricare il supporto delle provette. ▣▣▣▣ Avviare la procedura di preparazione della PCR. 	
<ul style="list-style-type: none"> ▣▣▣▣ Una volta terminata la procedura di preparazione della PCR, sigillare la piastra PCR utilizzando il sigillante perforabile Pierce Seal e una termosigillatrice. Utilizzare una temperatura di sigillatura di 170°C e una durata di 2,0 secondi. 	
<ul style="list-style-type: none"> ▣▣▣▣ Trasferire la piastra sigillata nel ciclatore PCR e avviare il relativo programma. 	
<ul style="list-style-type: none"> ▣▣▣▣ Una volta terminata la procedura di preparazione della PCR, avviare lo scaricamento e chiudere la piastra di eluizione. ▣▣▣▣ Avviare la procedura di pulizia. 	

12.2.2 Locale 2: preparazione manuale della PCR

Locale 2

OPZIONALE:

- Aggiungere 5 µl di template di DNA per ciascuna reazione di PCR.
- Mescolare con cura.



- Qualora sia stata utilizzata una piastra PCR, sigillare la piastra utilizzando il sigillante perforabile Pierce Seal e una termosigillatrice. Utilizzare una temperatura di sigillatura di 170°C e una durata di 2,0 secondi.



- Avviare la reazione di PCR con il programma del termociclatore impostato.

Tempo	Temp. °C	N° di cicli
20 min	37°C	1
15 min	95°C	1
30 s	95°C	40
25 s	55°C	
45 s	72°C	
30 s	95°C	15
45 s	72°C	
Sospensione	10°C	



12.3 Locale 3: ibridazione - preparazione / reazione di ibridazione

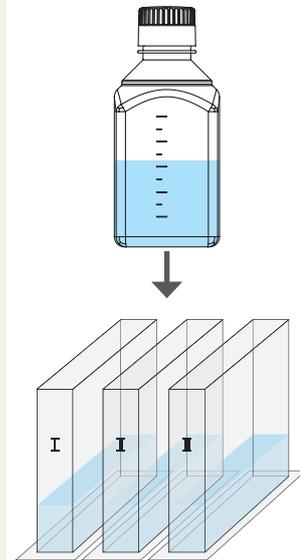


Iniziare le preparazioni almeno 30 minuti prima dell'ibridazione.

- Disciogliere gli eventuali precipitati nei tamponi di ibridazione e di lavaggio e mescolare con cura.
- Preparare la miscela per soluzione di lavaggio per quattro biochip PapilloCheck®.

Componenti	
Acqua distillata o deionizzata	560 ml
Tampone A PapilloCheck®	56 ml
Tampone B PapilloCheck®	7 ml
Volume totale	623 ml

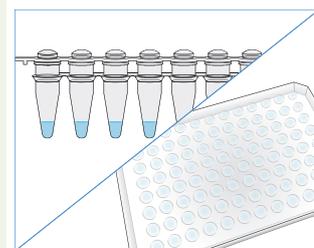
- Aliquotare la miscela per soluzione di lavaggio in tre vaschette oCheck®.
- Preriscaldare la soluzione di lavaggio II in bagno termostatico a **50°C**.



- Incubare i biochip PapilloCheck® da analizzare nella camera di ibridazione appositamente predisposta a temperatura ambiente.



- Mescolare i prodotti di PCR e sottoporre a breve spin-down
- Mescolare il tampone di ibridazione e sottoporre a breve spin-down
- Miscelare **30 µl** di tampone di ibridazione PapilloCheck® con **5 µl** di prodotto di PCR.
- Mescolare con cura e sottoporre a breve spin-down.



- Trasferire **25 µl** di miscela di ibridazione in ciascun pozzetto del biochip PapilloCheck® usando una pipetta multicannale.
- Evitare la formazione di bolle d'aria.

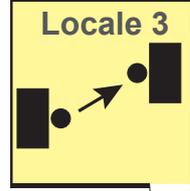


- Incubare il biochip PapilloCheck® per **15 minuti** esatti a **temperatura ambiente (20-25°C)**.

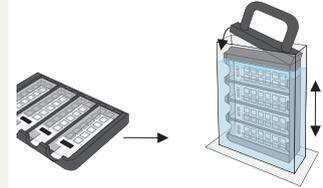


12.4 Locale 3: lavaggio ed essiccamento / scansione e valutazione

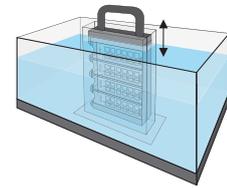
Ibridazione
e lavaggio



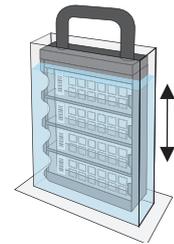
- Rimuovere il portavetrini magnetico dalla camera di ibridazione
- Far scivolare il portavetrini nella vaschetta di lavaggio oCheck® con la soluzione di lavaggio I.
- Fissare la maniglia oCheck®.
- Lavare i biochip PapilloCheck® nella soluzione di lavaggio I a **temperatura ambiente per 10 secondi**.



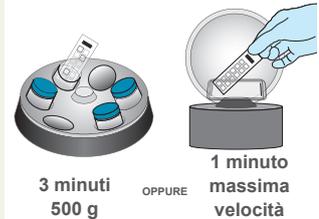
- Lavare i biochip PapilloCheck® nella soluzione di lavaggio II preriscaldata in bagno termostatico a **50°C per 60 secondi**.



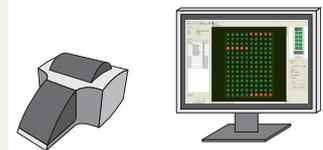
- Lavare i biochip PapilloCheck® nella soluzione di lavaggio III a **temperatura ambiente per 10 secondi**.



- Eliminare qualsiasi traccia di liquido dalla superficie dei biochip PapilloCheck® mediante centrifugazione.



- Sottoporre a scansione i biochip PapilloCheck® con CheckScanner™.
- Per la scansione e l'analisi consultare le istruzioni del manuale d'uso del software CheckReport™.
- Generare i report.



P
R
O
T
O
C
O
L
L
O

B
R
E
V
E