

Ingebrigtsen, Hanna Sundberg

Utprøving og validering av en kommersiell HPV genotypetest til bruk på formalinfiksert og parafininnstøpt vev

Testing and validation of application of a commercial cervix HPV genotype test for formalin-fixed paraffin-embedded tissue

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Dai, Hong Yan

Medveileder: Prestvik, Wenche Slettahjell

Mai 2023

Ingebrigtsen, Hanna Sundberg

Utprøving og validering av en kommersiell HPV genotypetest til bruk på formalinfiksert og parafininnstøpt vev

Testing and validation of application of a commercial cervix HPV genotype test for formalin-fixed paraffin-embedded tissue

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Dai, Hong Yan
Medveileder: Prestvik, Wenche Slettahjell
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forkortelser og begreper

AGUS	“Atypical glandular cells of undetermined significance” Atypiske sylinderepitelceller av usikker opprinnelse
Ahus	Akershus Universitetssykehus
AIS	Adenokarsinoma in situ
Anogenitalia	Området rundt endetarmsåpningen og de ytre kjønnsorganene
Cervix	Livmorhals
CIN	“Cervical intraepithelial neoplasi”
CIN1/LSIL	Lette celleforandringer
CIN2/HSIL	Moderate celleforandringer
CIN3/HSIL	Grove celleforandringer
CMTA	Catcher Melting Temperature Analysis
DPO	Dual-Priming Oligonucleotides
FFPE	Formalinfiksert og parafininnstøpt vev
HPV	Humant papillomavirus
HR-HPV	Høyrisiko HPV
HSIL	Høygradig skvamøs intraepitel lesjon
LR-HPV	Lavrisiko HPV
LSIL	Lavgradig skvamøs intraepitel lesjon
Peritoneum	Bukhinnen
Portio	Livmorhalstapp
TOCE	Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension
Tonsiller	Mandlene i halsen

Forord

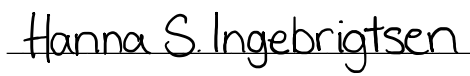
Dette prosjektet er en avsluttende del av min bioingeniørutdanning ved NTNU. Jeg fikk prosjektet tildelt av overingeniør Hong Yan Dai, PhD, ved Avdeling for patologi på St. Olavs Hospital i Trondheim, og alt det praktiske arbeidet ble utført ved avdelingens laboratorium i perioden mars til mai 2023.

Jeg vil rette en stor takk til min faglige veileder, Hong Yan Dai, for støtte og veiledning gjennom prosjektet. Jeg vil også takke fagansvarlig bioingeniør ved Seksjon for molekylær patologi, Torild Gladsø, for hennes hjelp med praktisk gjennomføring og svar på mine spørsmål. Jeg er svært takknemlig for at dere begge har brukt av deres arbeidstid til å hjelpe meg.

Jeg vil også takke min prosessveileder ved Institutt for bioingeniørfag, Wenche Prestvik, for alle timer hun har lagt ned i hjelp med akademisk skriving, teoriforståelse og perfektionering av bacheloroppgaven. Gjennom mange versjoner har hun vært en uvurderlig støtte, og jeg setter stor pris på hennes hjelp.

Til slutt vil jeg takke mine medstudenter, venner og familie for støtte og oppmuntring gjennom hele studietiden. Uten deres støtte ville jeg ikke ha vært i stand til å fullføre dette prosjektet.

Tolga, 16. mai 2023


Hanna Sundberg Ingebrigtsen

Sammendrag

Livmorhalskreft er den fjerde mest vanlige kreftformen blant kvinner på verdensbasis. I omtrent 95% av tilfellene skyldes sykdommen en persisterende infeksjon med HPV. Av de rundt 650 krefttilfellene som skyldes HPV i Norge, er rundt 365 tilfeller av livmorhalskreft, mens resten er andre kreftformer som kreft i anus, penis og svelg. Deteksjon av HPV-genotyper er viktig for pasienter med kreft og forstadier til kreft som ikke tidligere har blitt testet for HPV, eller som har negativ HPV-screening. Resultatene er av betydning for prognose og behandling.

I dette prosjektet ble Anyplex II HPV28 Detection utprøvd og validert for FFPE-prøver (formalinfikserte, parafininnstøpte prøver) ved St. Olavs Hospital. Totalt 15 kjente og 10 ukjente prøver ble analysert. De kjente prøvene hadde tidligere blitt analysert med Anyplex II HPV28 Detection på FFPE-prøver ved Akershus Universitetssykehus. Det ble også utført analyse av en fortynningsrekke ned til en 1000x fortykning av positiv kontroll.

Resultatene fra St. Olavs Hospital hadde for det meste samsvar med resultatene fra Akershus Universitetssykehus for de kjente prøvene. Noen av prøvene hadde flere genotyper detektert hos Akershus Universitetssykehus enn hos St. Olavs Hospital, og noen hadde flere genotyper detektert hos St. Olavs Hospital enn hos Akershus Universitetssykehus. Uoverensstemmelsene skyldtes trolig at ikke samme isolat ble benyttet ved begge sykehus, og var derfor ikke uventet. HR-HPV ble detektert i alle ukjente prøver, som gjenspeiler rutineprøver og er prøver med dysplasi som mistenkes å være HPV-relatert. Dette resultatet var derfor forventet. Alle HPV-genotyper ble detektert ned til en 500x fortykning av positiv kontroll, noe som viser at positiv kontroll er svært konsentrert.

På bakgrunn av forventede resultater i analyse av kjente og ukjente prøver, konkluderes det med at Anyplex II HPV28 Detection kan benyttes på FFPE-prøver ved St. Olavs Hospital. Det anbefales å fortynne positiv kontroll før bruk for å unngå falsk trygghet og redusere risiko for kontaminering av øvrige prøver.

Abstract

Cervical cancer is the 4th most common cancer in women worldwide. 95% of cervical cancer cases are related to a persistent infection with HPV. About 650 cancer cases each year in Norway are related to HPV, in which about 365 are cases of cervical cancer. The remaining cases include cancer of the anus, penis and throat. HPV genotype detection is an important examination for patients which have not previously been tested, or which are screened negative for HPV. The results are relevant for prognosis and treatment.

In this project, Anyplex II HPV28 Detection were tested and validated for FFPE-samples at St. Olavs Hospital, Trondheim University Hospital. 15 known and 10 unknown FFPE samples were tested. The known samples were previously tested at Akershus University Hospital with Anyplex II HPV28 Detection. A dilution series down to 1000x dilution of the positive control were analyzed.

Results of known samples from Akershus University Hospital mostly matches results from St. Olavs Hospital, Trondheim University Hospital. In some samples, there are detected more HPV genotypes in Akershus compared to Trondheim, and in other samples more HPV genotypes are detected in Trondheim compared to Akershus. As different isolates from the FFPE sample are made in Akershus and Trondheim, the mismatch is not unexpected. High risk HPV genotypes are detected in all the unknown samples. The unknown samples, samples with suspected HPV related dysplasia, reflects routine samples in Trondheim. High risk HPV genotypes in these samples are expected. All HPV genotypes are detected in a 500x dilution of the positive control. This indicates that the positive control is highly concentrated.

With expected results of both known and unknown samples, the conclusion is that Anyplex II HPV28 Detection can be used for FFPE samples at St. Olavs Hospital, Trondheim University Hospital. It is recommended to make a dilution of the positive control to avoid false safety and to reduce the risk of contamination in following samples.

Innholdsfortegnelse

Forkortelser og begreper	i
Forord	ii
Sammendrag	iii
Abstract	iv
1.0 Innledning	1
1.1 HPV.....	1
1.2 Infeksjon med HPV	2
1.3 HPV og kreft	3
1.4 Livmorhalskreft	5
1.4.1 Livmorhalsprogrammet.....	6
1.4.2 Cytologi.....	7
1.4.3 Histologi.....	7
1.4.4 HPV DNA-test	7
1.5 PCR.....	8
1.5.1 Real time PCR (qPCR).....	8
1.5.2 Multiplex qPCR	9
1.6 Deteksjon av PCR-produkt	9
1.6.1 TOCE™-teknologi.....	9
1.6.2 DPO™ primere	11
1.6.3 Smeltepunktanalyse.....	12
1.7 Problemstilling.....	13
2.0 Materiale og metode	15
2.1 Prøvemateriale og pasientprøver	15
2.2 Kontroller.....	16
2.3 Reagenser og utstyr.....	16
2.4 Prøveopparbeidelse	17
2.4.1 Isolering av DNA fra pasientprøver	17
2.4.2 Måling av DNA-konsentrasjon	18
2.5 Utførelse av analysen.....	18

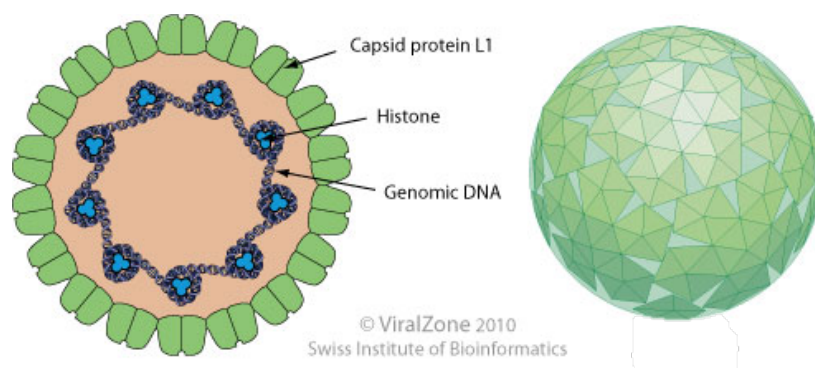
2.6 Dataanalyse	19
2.7 Undersøkelse av spesifisitet	20
2.8 Undersøkelse av positiv kontroll.....	20
2.8.1 Tillaging av fortynningsrekke.....	20
3.0 Resultat	21
3.1 Analyse av kjente prøver.....	21
3.2 Analyse av ukjente prøver.....	22
3.3 Fortynningsrekke	22
4.0 Diskusjon	24
5.0 Konklusjon	25
6.0 Referanser.....	26
7.0 Vedlegg.....	30
Vedlegg 1: Utdrag av prosedyre for DNA-isolering fra FFPE-vev	30
Vedlegg 2: Utdrag av prosedyre for bruk av QIAcube i DNA-isolering fra FFPE-vev.....	35
Vedlegg 3: Utdrag av prosedyre for måling av DNA-konsentrasjon med Qubit 2.0.....	39
Vedlegg 4: Målt DNA-konsentrasjon i pasientprøver	44
Vedlegg 5: Rådata fra analyse av pasientprøver.....	45

1.0 Innledning

På verdensbasis er livmorshalskreft (cervix-kreft) den fjerde mest vanlige kreftformen hos kvinner, og i 2020 døde over 600 000 kvinner av kreftformen (1). Det kan være flere årsaker til livmorshalskreft, men i ca. 95% av tilfellene er HPV årsaken. I Norge skyldes rundt 650 tilfeller HPV, hvor rundt 365 av de er livmorshalskreft. De resterende tilfellene er andre kreftformer hos både kvinner og menn (2).

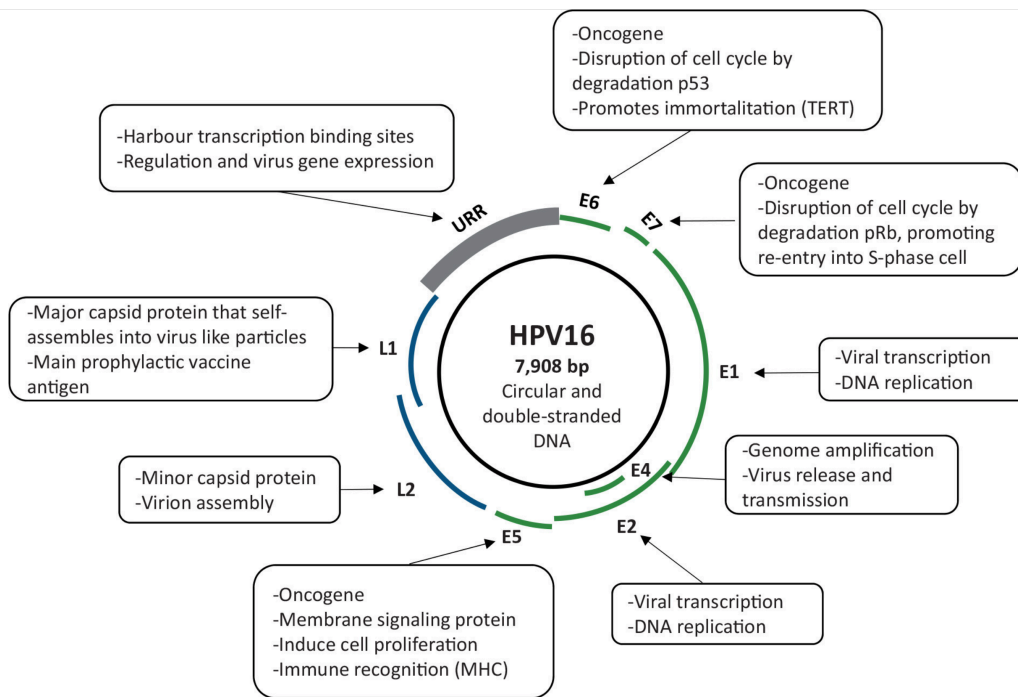
1.1 HPV

HPV (humant papillomavirus) er en gruppe DNA-virus som tilhører familien Papillomaviridae med over 200 ulike genotyper. Viruset er nakent (mangler lipidmembran), med en mangekantet proteinkappe som måler 55nm i diameter. Viruset er illustrert i Figur 1.



Figur 1: Illustrasjon av HPV-virusets struktur med kapsid, histoner og arvestoff. (3)

HPVs genom, illustrert i Figur 2, er sirkulært, dobbeltrådet DNA med en størrelse på ca 8000 nukleotider. Genomet inneholder åtte gener, navngitt E («early») eller L («late»), etter når i virusets syklus de uttrykkes. Proteinene som kodes av E1 og E2 regulerer genuttrykket til virus. E4 er viktig for virusfrigjøring, E5 stimulerer til celledeling, og E6 og E7 regulerer cellyklus. L1 og L2 koder for strukturproteiner som utgjør virusets kapsid. I tillegg til L- og E-genene inneholder også HPVs genom en ikke-kodende kontrollregion (4). Den ikke-kodende regionen inneholder en promoter, som initierer uttrykk av «early»-genene når den aktiveres av at virus-DNA trenger inn i vertscellens kjerne (5).



Figur 2: HPV's genom inneholder åtte kodende gener og en ikke-kodende del, «upstream regulatory region» (URR), som regulerer genuttrykket og er viktig for replikasjon. E1 og E2 er viktige for virustranskripsjon og -replikasjon. E4 spiller en rolle i amplifikasjon og virusfrigjøring, og E5, E6 og E7 er onkogenene. E6 og E7 er de viktigste onkogenene, som påvirker vertscellens cellesyklus ved blokkering av p53 og pRb (6).

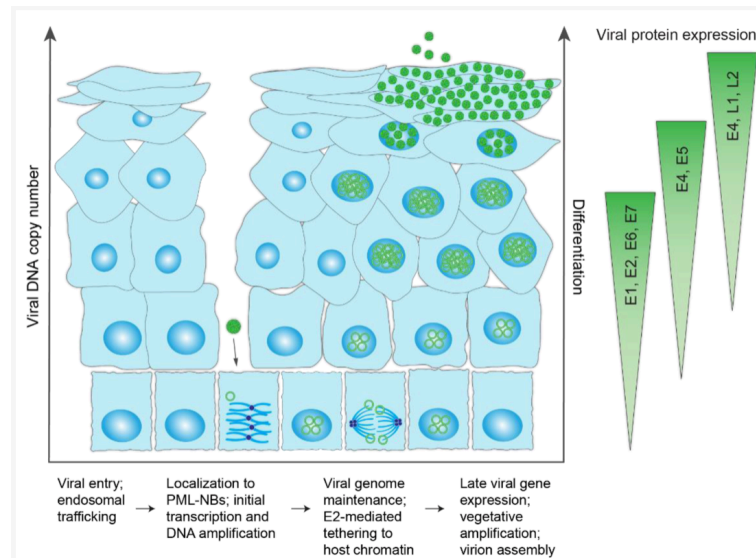
1.2 Infeksjon med HPV

Det er anslått at 10% av den norske befolkningen til enhver tid har en aktiv HPV-infeksjon, og at 70% av befolkningen vil være infisert minst en gang i løpet av livet. Infeksjon som har forårsaket kreft er meldepliktig til MSIS (meldingssystem for smittsomme sykdommer) (7).

HPV smitter gjennom direkte kontakt mellom smittet og frisk person, men kan ikke trenge gjennom hel hud eller slimhinner. Viruset krever en rift eller skade i hud/slimhinne for å nå frem til basallaget, som er cellene HPV infiserer. HPV kan bare dele seg i differensierte plateepitelceller, som gjør viruset svært vevs- og celledoesespesifikt. I basalcellene i hud og slimhinner danner viruset en persisterende infeksjon (4). Viruset kan trolig ligge latent i hud og slimhinner i mange år, før det reaktiveres og gir infeksjon ved for eksempel immunsuppresjon (8). Denne teorien understøttes av hyppige HPV-infeksjoner blant immunosupprimerte, som for eksempel HIV-positive pasienter (9). Inkubasjonstiden varierer fra én måned, til seks måneder (4).

Når infiserte celler i basallaget prolifererer, replikeres også virus-DNA. Etter hvert som de infiserte basale cellene naturlig differensieres på vei opp mot overflaten, vil mer av virusets

proteiner uttrykkes. Overflateproteinene L1 og L2, som danner kapsidet, vil kun uttrykkes i de øverste epitelcellene. Når infiserte epitelceller dør og utstøtes fra slimhinnen, skilles viruspartiklene ut, se Figur 3 (4,8).



Figur 3: Illustrasjon av HPV-infisert epitel. Viruset infiserer de basale cellene, og følger differensieringen til de infiserte cellene oppover i epitelet. E1, E2, E6 og E7 er de første virale genene som uttrykkes. Senere i de infiserte cellenes differensiering uttrykkes også E4, E5, L1 og L2. E6 (10)

Av de over 200 genotypene, er 40 relatert til infeksjoner i slimhinner (7). Disse deles igjen inn i høy- og lavrisikotyper av HPV (4). Lavrisikotypene 6 og 11 assosieres med vorter i genitalia og andre steder på kroppen, og celleforandringer i cervix som går over av seg selv. Høyriskotypene kan forårsake kreft, hvor spesielt type 16 og 18 gir høy risiko (7). Det er ikke uvanlig å bli smittet med flere genotyper samtidig på grunn av fellestrekk i de ulike typenes patogenese (9). Livmorhalskreft er den HPV-assosierte krefttypen med flest tilfeller årlig, men også kreft i munn og svelg, endetarm, skjede, ytre kjønnsorganer og penis kan assosieres med HPV-infeksjon (7). Infeksjon med HPV vil i de fleste tilfeller gå over av seg selv innen ett til to år etter viruseksponering, uavhengig av om infeksjonen har gitt forstadier til kreft eller ikke (9).

1.3 HPV og kreft

Ulike genotyper av HPV assosieres med kreft i ulik grad, som vist i Tabell 1. Infeksjon med HPV er svært vanlig, og en forbigående infeksjon vil ikke føre til forstadier eller kreft. En

kronisk eller vedvarende infeksjon er dog en forutsetning for første trinn i utvikling av forstadier og eventuelt senere kreft. Andre faktorer hos virus og vert spiller trolig også en rolle i kreftutvikling siden en så lav andel av HPV-smittede utvikler kreft, men disse faktorene er ikke fullstendig kartlagte (8). Kofaktorerens mekanisme er også ukjent (9).

Tabell 1: Risikofordeling av HR-HPV genotyper som affiserer slimhinner og hud. 40 av over 200 kartlagte genotyper av HPV infiserer slimhinner og huden i anogenitalia. Disse 40 assosieres med utvikling av kreft i ulik grad. 12 av typene klassifiseres som høyrisiko HPV (HR-HPV), 12 som mulig HR-HPV og 1 som sannsynlig HR-HPV. Av de 15 siste typene, er blant annet 2 typer som assosieres med kondylomer (kjønnsvorter). Uthevet er HR-HPV som gir spesielt høy risiko for kreftutvikling. Sammen med de åtte typene markert i kursiv, forårsaker disse om lag 90% av alle krefttilfeller (8).

<i>HR-HPV</i>	<i>Sannsynlig HR-HPV</i>	<i>Mulig HR-HPV</i>	<i>Kondylomer</i>
16	68	26	6
18		30	11
<i>31</i>		34	
<i>33</i>		53	
<i>35</i>		66	
<i>39</i>		67	
<i>45</i>		69	
<i>51</i>		70	
<i>52</i>		73	
<i>56</i>		82	
<i>58</i>		85	
<i>59</i>		97	

En vedvarende HR-HPV-infeksjon øker risikoen for at infeksjonen transformeres. Da vil det dannes flere av virusproteinene E6 og E7, som kan ødelegge p53 og pRb, to viktige proteiner i vertscellen som regulerer cellyklus. Dette skjer oftest som følge av integrasjon av virus-DNA i vertens genom, slik at deler av E2, som regulerer uttrykket av E6 og E7, mistes (8). Dette er likevel ikke påvist i alle krefttilfeller, og antas derfor ikke å være en nødvendighet for kreftutvikling (11). Høyt uttrykk av E6 og E7 er derimot vesentlig for opprettholdelse av kreftutviklingen. Jo lengre infeksjonen vedvarer, jo høyere er risikoen for at infeksjonen transformeres og det kan utvikles forstadier og eventuelt senere kreft (12). Flere års infeksjon er sterkt relatert til utvikling av forstadier. Den beste faktoren for å avgjøre risiko for persistent infeksjon og forstadier, er å detektere genotypen, da ulike genotyper gir infeksjoner med ulik

varighet. I tillegg til at noen genotyper er sterkere assosiert med kreftutvikling enn andre, er også infeksjon med flere genotyper samtidig totalt sett assosiert med større risiko enn infeksjon med bare én av de samme genotypene (9).

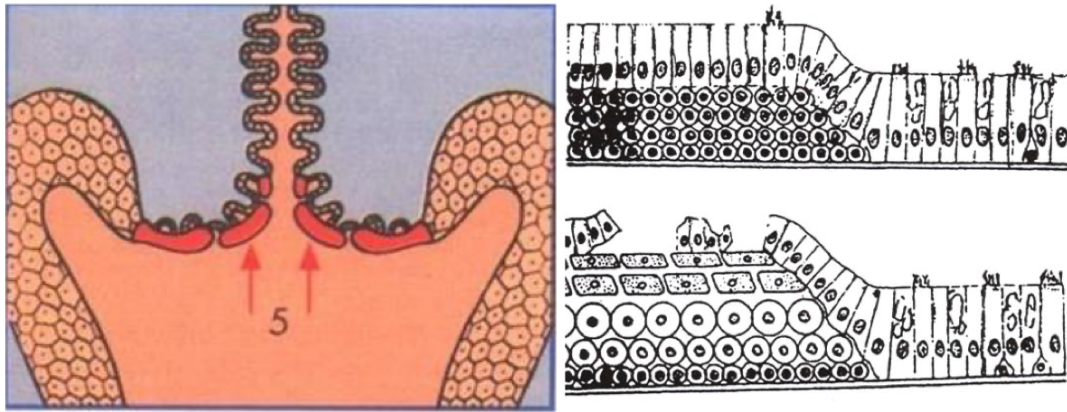
HPV-vaksinen har vært en del av barnevaksinasjonsprogrammet for jenter siden 2009 på grunn av den høye forekomsten av livmorhalskreft. Fra 2018 har også gutter fått tilbud om vaksinen på grunn av økende forekomst av kreft i analkanalen, penis og hals som skyldes HPV (13). Siden HPV er den vanligste seksuelt overførbare sykdommen, vil vaksinasjon av gutter også begrense HPV-spredning til uvaksinerte jenter. Vaksinen gir god beskyttelse mot HPV 16 og 18, men også delvis beskyttelse mot HR-HPV typene 31, 33 og 45 gjennom kryssbeskyttelse (12).

1.4 Livmorhalskreft

I Norge var livmorhalskreft med 4.7% av alle krefttilfeller den sjette vanligste kreftformen for kvinner i 2021. Samme år døde 79 kvinner av kreftformen. Det har siden 80-tallet vært en nedgang i antall diagnostiserte og antall døde. Viktige faktorer for denne utviklingen er bedre behandling og at sykdommen oppdages i tidligere stadium ved hjelp av screening (14).

Livmorhalskreft behandles etter størrelse på svulst og sykdomsstadium. Ved diagnostikk i et tidlig stadium er det ofte nok å operere vekk svulsten. Andre alternativer er strålebehandling i kombinasjon med cellegift og målrettet behandling (15).

80-90% av livmorhalskrefttilfellene er plateepitelkarsinom, og nesten alle av disse er HPV-relaterte. 10-25% av livmorhalskrefttilfellene er adenokarsinom. De fleste av disse er også HPV-relaterte, men det finnes også noen sjeldne adenokarsinom som ikke skyldes HPV (16). Kreften utvikles i de fleste tilfeller der hvor cellene går over fra plate- til sylinderepitel, i eller nær overgangssonen på livmorhalstappen. Transformasjonssonen gjennomgår metaplasi, omdanning fra en celletype til en annen, flere ganger i løpet av livet i forbindelse med skade på sylinderepitelet ved blant annet pubertet, graviditet og spiralbruk. Da erstatter metaplastisk epitel skadet enlaget sylinderepitel, vist i Figur 4. Umodne celler, som dannes under utskiftningen av cellene, er mer følsomme for HPV-infeksjon (8,12). Den korte avstanden ned til basalcellelaget i dette området medvirker også (4).



Figur 4: Illustrasjon av transformasjonssonen hvor metaplastisk epitel erstatter skadet enlaget sylinderepitel (17).

Ved forstadium til kreft, er store deler av cervixslimhinnens celler byttet ut med lavt differensierte celler. Forstadier går over til å være kreft når kreftcellene infiltrerer basalmembranen og trenger inn i cervix. Å utføre en studie på hvor mange forstadier som utvikles til kreft vil være uetisk siden alle forstadier skal behandles, men en studie fra New Zealand på 90-tallet viser en risiko på 20-30% for utvikling av kreft fra et forstadium innen fem til ti år (18).

1.4.1 Livmorhalsprogrammet

Livmorhalsprogrammet ble etablert i 1995 og administreres av Kreftregisteret. Det er en screening som tilbys til kvinner mellom 25 og 69 år. Det er ikke screeningprogram for de andre HPV-medierte kreftformene i Norge (19).

En screening, eller en masseundersøkelse, er en systematisk undersøkelse av friske mennesker. Screening reduserer dødelighet av en sykdom ved sykdommen oppdages, og dermed også behandles, tidligere. Livmorhalskreftscreening virker også forebyggende da påviste forstadier gjennom screening kan fjernes før de utvikles til kreft. Men screening kan også føre til overbehandling siden også celleforandringer som ikke ville utviklet seg videre behandles, da screeningen ikke sier noe om hvor raskt eller langt et påvist forstadium vil utvikles (19). Noen vil også kunne utvikle kreft uten at dette oppdages i screeningprogrammet, da hurtigvoksende kreft kan utvikles mellom to undersøkelser, og tidlig kreft kan være uoppdaget til tross for screeningdeltagelse (20).

I Norge har det vært to screeningprogram. Cytologi for kvinner mellom 25 og 33 år, og HPV DNA-test for kvinner mellom 34 og 69 år. Fra 1. juli 2023 skal alle kvinner mellom 25 og 69

år tilbys HPV DNA-test som screening. Ved en HPV DNA-test kan risiko for kreftutvikling oppdages på et tidligere tidspunkt enn ved cytologi, siden virus-DNA kan oppdages før det blir skade på cellene (21,22).

1.4.2 Cytologi

Cytologiske prøver deles inn i tre hovedkategorier; normal prøve, LSIL (lavgradig skvamøs intraepitel lesjon) og HSIL (høygradig skvamøs intraepitel lesjon), som forbindes med henholdsvis lav, middels og høy risiko for kreftutvikling. Prøven kan også svares ut som AGUS (atypical glandular cells of undetermined significance) og AIS (adenokarsinoma in situ) dersom det finnes unormale celler i prøven som *ikke* er fra cervix, eller som uegnet dersom prøven ikke er egnet for vurdering. Uegnede prøver kan skyldes blant annet blod og slim, eller gel fra prøvetakingen (12). Biopsi bekrefter en celleforandring indikert ved cytologi, og utføres på HSIL-prøver. LSIL-prøver følges opp med HPV-test og ny cytologi eller HPV-test avhengig av kvinnens alder (21).

1.4.3 Histologi

Celleforandringer i cervix funnet i biopsi, kalles CIN (cervical intraepithelial neoplasi). Lette, moderate og grove forandringer svares ut som henholdsvis CIN1, CIN2 og CIN3. CIN3 har en høyere risiko for kreftutvikling, men *kan* gå tilbake av seg selv og er *ikke* kreft, siden cellene ved CIN3 ikke har infiltrert basalmembranen og trengt inn i cervix. LSIL indikerer CIN1, mens HSIL indikerer CIN2 eller CIN3. Det er ikke mulig å skille CIN2 og CIN3 cytologisk (12). CIN1 indikerer HPV-infeksjon, men defineres ikke som et forstadium til kreft (9). Det er vist at diagnostikk av CIN1 ikke indikerer en signifikant høyere risiko for videre utvikling til CIN3, enn hva en negativ biopsi gjør (23).

1.4.4 HPV DNA-test

Det er vist at HPV DNA-tester er mer sensitive enn cytologi ved høygradige celleforandringer (12). Bare en tredjedel av HPV positive kvinner har synlige cytologiske forandringer (9). En kan derfor si at kvinner med negativ HPV DNA-test vil ha lavere risiko for å utvikle kreft enn kvinner med normal cytologi, og intervallet mellom to HPV DNA-tester kan derfor være lengre enn mellom to cytologiske prøver (12).

HPV er en lokal infeksjon, den hverken sprer seg eller går over i blodet, og kan derfor ikke påvises i en blodprøve. Prøvematerialet til HPV DNA-test tas direkte fra cervix. Mengden HPV-DNA som påvises i celleprøver fra cervix er tvetydig, og varierer med antall unormale celler, størrelsen på de unormale cellene og hvor langt de unormale cellene er kommet i utviklingen. Benigne infeksjoner, som kondylomer, kan produsere store mengder virus og derfor påvises i store mengder. HPV DNA-tester i livmorhalsprogrammet utføres på samme prøve som cytologi (12).

1.5 PCR

PCR er en molekylærbiologisk metode for amplifikasjon av DNA. Metoden krever svært lite utgangsmateriale, og den eneste forutsetningen for amplifikasjonen er at om lag 20 baser i hver ende av ønsket amplifisert DNA-segment er kjent (24).

Kort forklart denatureres DNA i prøven til enkeltråder, som så benyttes som mal for komplementære dattertråder. Ved en temperatur på 94-95 °C, vil DNA denatureres ved at hydrogenbindingene mellom baseparene brytes. Videre utføres en hybridisering hvor temperaturen senkes slik at to primere, syntetiske korte fragmenter av enkeltrådet DNA med en bestemt baserekkefølge, binder til DNA-templatet og definerer den delen av DNA vi ønsker å amplifisere. Optimal temperatur for hybridiseringstrinnet varierer etter primernes sammensetning. Høyere temperatur kan øke spesifisiteten. Med primere bundet i hver ende av ønsket amplifisert DNA-segment, økes temperaturen til om lag 72 °C, som er optimal temperatur for DNA-polymerase. DNA-polymerase binder nukleotider til 3'-OH-gruppene på begge primere med DNA-templatet som mal. Resultatet er dobbeltrådet DNA identisk til ønsket amplifisert DNA-segment, bestående av en original tråd, og en ny-syntetisert tråd. Antall produkter vil teoretisk sett, hvis reaksjonen har 100% effektivitet, dobles i hver syklus. Prosessen gjentas til ønsket mengde DNA er oppnådd, gjerne mellom 25 og 40 sykluser avhengig av blant annet utgangskonsentrasjon og effektivitet. Flere sykluser vil øke risikoen for at uspesifikke produkter amplifiseres. Siden PCR styres av temperaturendringer, er det også viktig at DNA-polymerase er varmestabil (24).

1.5.1 Real time PCR (qPCR)

qPCR baseres på de samme reaksjonsprinsippene som konvensjonell PCR, men benytter fluorescens til deteksjon av PCR-produkter. Av dette får man mulighet til å observere PCR-

amplifikasjonen underveis i reaksjonen (25). qPCR er med andre ord svært tidsbesparende i forhold til konvensjonell PCR, hvor PCR-produktene detekteres med hjelp av analyser som gelelektroforese etter endt PCR (26).

I qPCR både amplifiseres og kvantifiseres målsekvensen i samme instrument. Kvantifiseringen gjøres i den eksponentielle fasen i PCR, hvor mengden målsekvens dobles for hver syklus. I denne fasen er det ingen begrensende reaktanter. Derfor har qPCR bedre kvantitativ presisjon enn konvensjonell PCR, hvor måling gjøres i reaksjonens endepunkt (27).

1.5.2 Multiplex qPCR

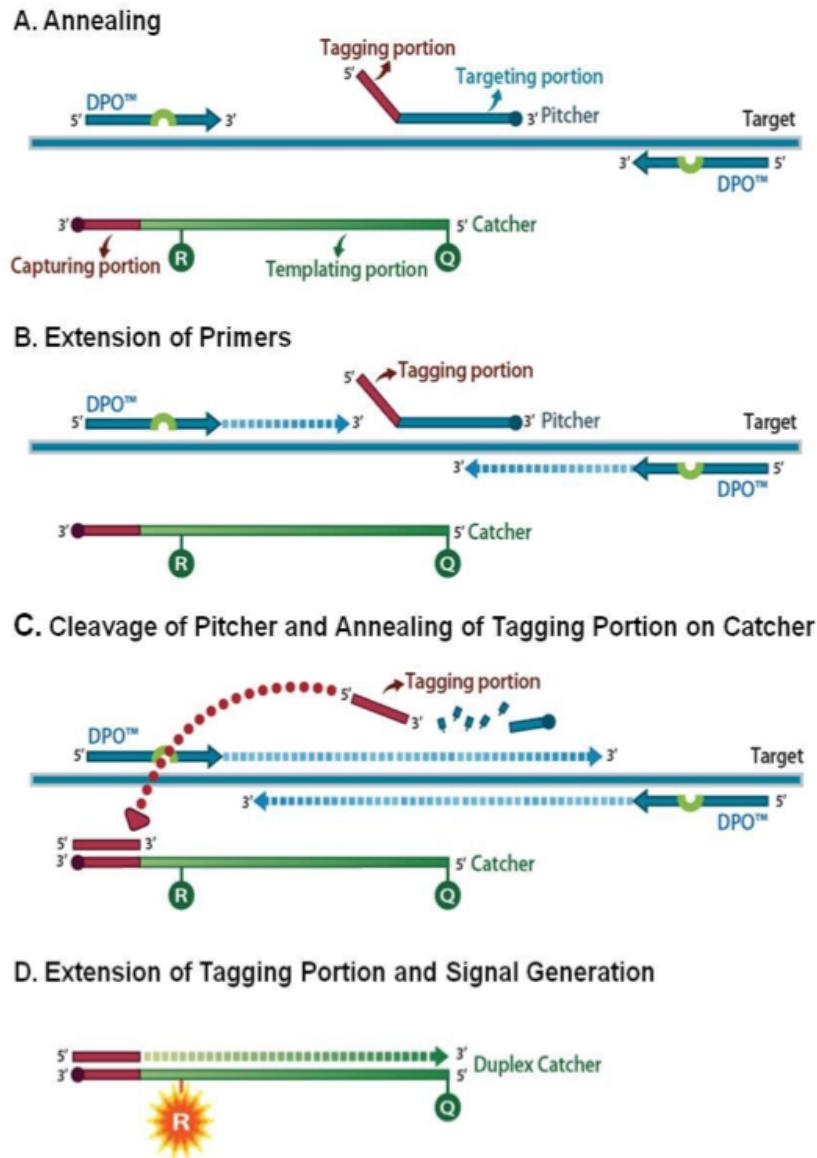
I multiplex qPCR amplifiseres og detekteres flere målsekvenser i samme brønn. Det vanligste er duplexing, hvor to sekvenser amplifiseres, men det kan også utføres amplifikasjon og deteksjon av flere enn to sekvenser (28). Multiplex PCR er både tids- og kostnadseffektivt, siden flere sekvenser kan detekteres i samme analyseoppsett (29). Multiplexing vil også kreve mindre prøvemateriale enn å utføre flere singleplex, og har bedre presisjon ved at pipetteringsfeil reduseres (28).

1.6 Deteksjon av PCR-produkt

PCR-produkter kan detekteres på ulike måter i qPCR. TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension) er en teknologi utviklet av Seegene for deteksjon og differensiering av fem eller flere målsekvenser i samme brønn ved multiplex qPCR. ed bruk i kombinasjon med cyclic-CMTA, er analysen også semikvantitativ.

1.6.1 TOCE™-teknologi

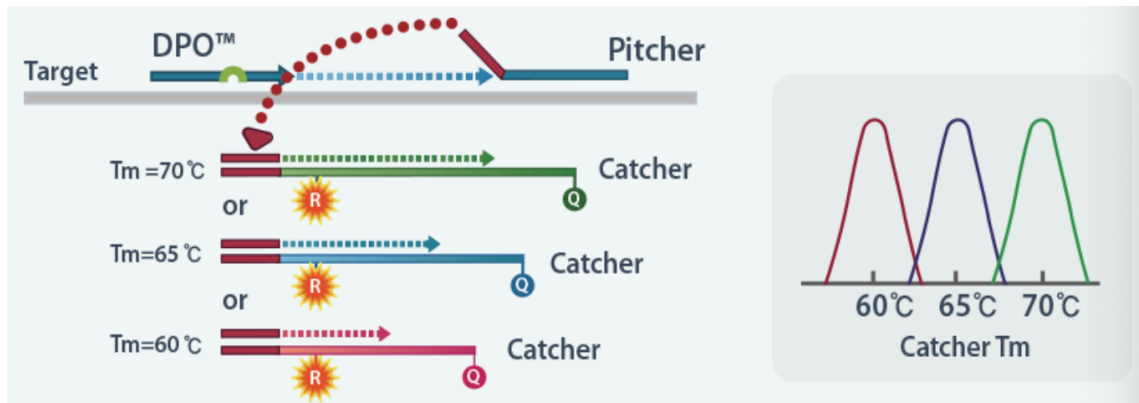
TOCE™-teknologien består av et DPO™ (Dual-Priming Oligonucleotides) primerpar, en pitcher som spesifikt hybridiserer til målsekvensen, og en catcher som er et syntetisk DNA-templat. Til catcheren er det bundet to molekyler, et fluorescerende molekyl (reporter) og et inhiberende molekyl (quencher) (30). Til pitcheren er det bundet en spesifikk oligonukleotidtag for målsekvensen, som binder til en spesifikk catcher. Prinsippet er illustrert i Figur 5.



Figur 5: Illustrasjon av prinsipp for TOCE-teknologien. (A) Reaksjonen initieres med hybridisering av DPO-primerparet og en pitcher. (B) Polymerisering fra primerene fører til kløyving av pitcherens tag, som (C) binder til catcheren. (D) Duplex catcher har en definert smeltepunktprofil og medierer et signal fra reporteren på catcheren (31).

TOCE gir mulighet for deteksjon av flere målsekvenser gjennom utførelse av smeltepunktanalyse av catcheren, som har et spesifikt smeltepunkt. Når PCR-reaksjonen begynner, vil DPO-primerparet og pitcheren hybridisere til sine spesifikke sekvenser på målsekvensen. I hver syklus vil DNA polymerase forlenge primeren, og kløyve av pitcheren. Kløyving av pitcheren vil føre til frigjøring av pitcherens oligonukleotidtag, som hybridiserer til catcheren, og som forlenges slik at catcheren blir dobbeltrådet. Produktet kalles «duplex catcher». Den fysiske avstanden som dannes mellom den fluoriserende reporteren og quencheren på duplex catcher ved at catcheren strekkes ut når den blir dobbeltrådet, medierer

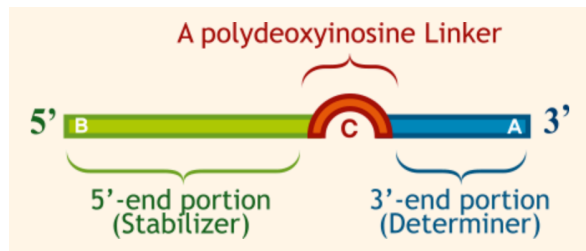
et signal. Mengden signal er proporsjonalt med mengden produkt, men uavhengig av målsekvensen. Det er catcherens definerte sekvens som gir en spesifikk smelteprofil i smeltepunktanalysen; CMTA (Figur 6). Teknologien er slik at signal ikke medieres ved mangel på en av komponentene, men at reaksjonen er direkte avhengig av at pitcheren kløyves og at oligonukleotidtaggen hybridiseres til catcheren og danner catcher duplex (31).



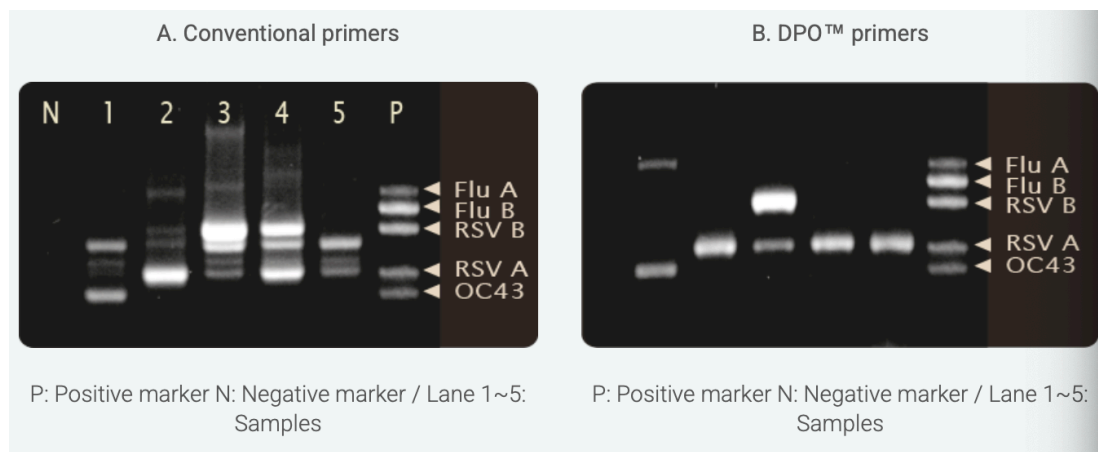
Figur 6: Illustrasjon av tre ulike catchere i Seegenes TOCE™-teknologi for multiplex qPCR. Sekvensering fra DPO-primere fører til kløyving av pitcherens tag, som binder til sin respektive catcher, spesifikk for en HPV genotype. Forlenging av taggen og dannelse av duplex catcher medierer et signal. Ulike catchere har ulike smeltepunktprofil, som tillater differensiering av PCR-produktene ved hjelp av en smeltepunktanalyse (30).

1.6.2 DPO™ primere

Bruk av DPO-primere øker spesifisitet og reduserer amplifikasjon av uspesifikke produkter i multiplex qPCR. Primerene, illustrert i Figur 7, er strukturelt ulike fra konvensjonelle primere ved at de har to bindingssteder til målsekvensen separert fra hverandre av en polydeoksyinosinlenke. Primerbindingen skjer i to steg, hvor stabilisatoren binder til templatet først. Syntese kan kun starte når begge delene av primeren er bundet til templatet. Lenken kontrollerer dermed om polymerase får starte kopiering av målsekvens. Med DPO-primere, så godt som elimineres også forekomsten av primer-dimere (32). Forbedringen i spesifisitet i forhold til konvensjonelle primere er vist i Figur 8.



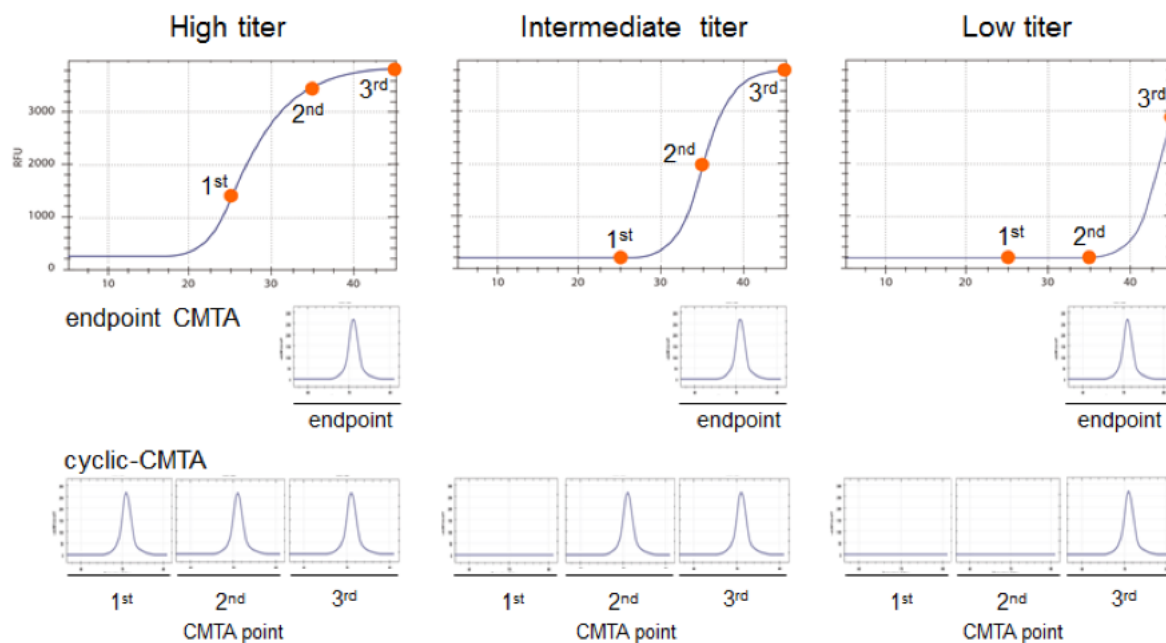
Figur 7: Illustrasjon av en DPO-primer med to bindingssteder (stabilizer og determiner) på hver side av en polydeoksyinosinlenke (33).



Figur 8: Sammenligning av resultater fra multiplex PCR med DPO-primere (til høyre) og konvensjonelle primere (til venstre) vist ved gelelektroforese av PCR-produkter. Viser hvordan bruk av DPO-primere nærmest eliminerer uspesifikk amplifikasjon i multiplex PCR (33).

1.6.3 Smeltepunktsanalyse

Vanligvis utføres smeltepunktsanalysen i slutten av PCR-reaksjonen for å bekrefte at riktig sekvens er amplifisert. Ulempen med dette er at kvantifisering er upresist ved måling i endepunkt da begrensende reaktanter påvirker resultatet. Ved cyclic-CMTA utføres tre smeltepunktsanalyser i ulike CMTA-punkter, etter bestemte antall sykluser i amplifiseringsprosessen. En målsekvens med høy titer (mange kopier) vil detekteres ved alle CMTA-punktene, en målsekvens med moderat titer ved de to siste CMTA-punktene, imens en målsekvens med lav titer ikke vil detekteres før ved det siste CMTA-punktet (34). Dette illustreres i Figur 9.



Figur 9: Multiplex qPCR ved hjelp av TOCE-teknologi og CMTA. Viser hvordan målsekvenser i høye, moderate og lave titer i prøven vil detekteres ved ulike CMTA-punkt i cyclic-CMTA, slik at semikvantifisering av målsekvensene er mulig. De øverste grafene viser plassering av CMTA-punktene, og hvordan lavere titer ikke vil gi signal i første CMTA-punkt. Grafene i midten viser end point-CMTA for de tre titrene (34).

Ved end point-CMTA gjøres kun én smeltepunktsanalyse, i reaksjonens endepunkt, og resultatet er enten positiv eller negativ for de ulike genotypene. Begge CMTA-metodene kan skille mellom ulike genotyper i en prøve infisert med flere genotyper, men bare cyclic-CMTA er semikvantitativt.

1.7 Problemstilling

Hensikten med prosjektet er utprøving og validering av et kommersielt test-kit for genotyping av HPV hos Avdeling for patologi på St. Olavs Hospital i Trondheim. Anyplex™ II HPV28 Detection er en kommersiell multiplex qPCR-metode for deteksjon og kvantifisering av 19 høyrisiko- og 9 lavrisikotyper av HPV i væskebaserte prøver. Metoden skal testes og valideres for bruk på FFPE-vev (formalinfixert og parafininnstøpt vev).

Det er i dag ingen metoder for påvisning av HPV-genotyper i FFPE-vev på St. Olavs Hospital. For væskebaserte prøver benyttes Cobas 4800 HPV DNA-test, som gir en kvalitativ påvisning av HPV 16, HPV 18 eller gruppen «annen høyrisiko HPV-type» (HR-HPV). Annen HR-HPV innebærer 12 HR-HPV genotyper (HPV type 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 og 69).

Analysen skiller ikke mellom disse typene. Dersom prøven ikke inneholder noen av de nevnte genotypene, vil prøven svares ut som negativ.

For å finne ut om kreftutvikling eller et forstadium til kreft hos en pasient kan relateres til HPV, er det viktig å få svar på om en tumor er HPV positiv eller negativ, og eventuelt for hvilken genotype, da dette kan ha betydning for prognose og behandling (35). Når det gjelder livmorhalskreft, kan HPV-status mangle på grunn av manglende deltagelse i screeningprogrammet. Andre årsaker kan være raskt utviklet kreftsykdom som er utviklet mellom to undersøkelser i screeningen, eller at pasienten har infeksjon med en HPV-type som ikke er omfattet av screeningprogrammet.

Kan AnyplexTM II HPV28 Detection benyttes på FFPE-prøver for deteksjon av HPV genotype på St. Olavs Hospital?

2.0 Materiale og metode

I dette kapittelet er benyttet prøvemateriale, kontrollmateriale og utstyr presentert. Utførelse av isolering og DNA-måling, testing av spesifisitetm, tillaging av fortynningsrekke og utførelse av «Anyplex II HPV28 Detection» på kontroll og pasientprøver er beskrevet.

2.1 Prøvemateriale og pasientprøver

I prosjektet ble det benyttet DNA-ekstrakt fra formalinfikserte og parafininnstøpte tumorbiopsier. Det ble analysert totalt 25 pasientprøver (Tabell 2), hvor 15 er prøver tidligere analysert ved Avdeling for mikrobiologi ved Akershus Universitetssykehus (Ahus) og resterende 10 er prøver med ukjent resultat. Prøvene er gitt en nummerverdi fra 3-27 av hensyn til personvern.

Tabell 2: Oversikt over humant prøvemateriale benyttet i prosjektet. Prøve nummer 3-17 har oppgitt tidligere funn etter analysering på Ahus, resterende 10 er ukjente prøver.

Prøve	Tidligere funn ^a	Type vev	Prøve	Tidligere funn ^a	Type vev
3	82	Portiobiopsi	16	6	Portiobiopsi
4	16	Portiobiopsi	17	26; 53	Portiobiopsi
5	44	Vulvaresektat	18		Tonsille
6	6; 44	Vulvaresektat	19		Tonsille
7	16	Portiobiopsi	20		Tonsille
8	70	Portiobiopsi	21		Tonsille
9	16; 53	Vulvabiopsi	22		Biopsier vaginal topp
10	45	Portiobiopsi	23		Cervixbiopsi
11	18	Nålebiopsi peritoneum	24		Cervixkon
12	18	Cervixbiopsi	25		Cervixkon
13	18	Biopsi tykktarmslimhinne	26		Cervixkon
14	11	Utskrapsmateriale cervix	27		Cervixkon
15	18	Lymfeknute obturator venstre			

^a Utført med Anyplex HPV28 Detection ved Ahus

2.2 Kontroller

Som negativ internkontroll ble det benyttet DNA-ekstrakt fra formalinfiksert og parafininnstøpt normalvev, altså ikke tumorvev. Internkontrollene er gitt prøvenummer 1 og 2 av hensyn til personvern. Prøve 1 består av DNA isolert fra egglederjev tatt ut ved sterilisering. Den har DNA-konsentrasjon på 35,5 ng/μL og ble benyttet i analyseoppsett med pasientprøver. Prøve 2 består av DNA isolert fra livmorvev. Den har DNA-konsentrasjon på 35 ng/μL og ble benyttet i analyseoppsett med fortynninger av positiv kontroll. Begge kontrollene ble fortynnet med RNase fritt vann til 10 ng/μL før bruk.

Som positiv kontroll ble tre prøver (PC1, PC2 og PC3, Seegene) med DNA fra ulike HPV genotyper benyttet. PC1 inneholder også humant DNA (Tabell 3). RNase fritt vann (Seegene) ble benyttet som non-template kontroll.

Tabell 3: Oversikt over de tre positive kontrollenes genotyper. Hver PC er positiv for 5 genotyper i A-sett (14 HR-HPV og IC) og 5 genotyper i B-sett (5 HR-HPV og 9 LR-HPV).

Kontroll	A-sett	B-sett
PC1 (Seegene)	66, 51, 33, 56, IC ^a	26, 42, 43, 44, IC ^a
PC2 (Seegene)	45, 59, 39, 35, 68	69, 82, 54, 61, 40
PC3 (Seegene)	58, 16, 52, 18, 31	73, 53, 70, 6, 11

^a IC = internkontroll, humant DNA.

2.3 Reagenser og utstyr

Til isolering av DNA og måling av DNA-konsentrasjon ble henholdsvis QIAmp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) og Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) benyttet. Til påvisning av HPV genotype ble Anyplex II HPV28 Detection kit (Seegene) benyttet, reagenser i kitet er listet i Tabell 4. Anyplex II HPV28 Detection er et qPCR-kit for amplifisering, deteksjon og kvantifisering av 19 HR-HPV typer (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 og 82) og 9 LR-HPV typer (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 og 70), i tillegg til en intern kontroll (IC) som påviser tilstedeværelse av humant vev. Analysen er basert på Seegenes TOCETM-teknologi for deteksjon av flere målsekvenser i qPCR.

Tabell 4: Reagenser i Anyplex II HPV28 Detection kit, samt deres funksjon/innhold.

Reagens	Funksjon/innhold
4X HPV28 A TOM (TOCE Oligo Mix)	Amplifikasjon og deteksjon
4X HPV28 B TOM (TOCE Oligo Mix)	Amplifikasjon og deteksjon
EM1	DNA polymerase Uracil-DNA glycosylase Buffer med dNTPer

Det er benyttet fem ulike fluoroforer i multiplex qPCR-analyse med Anyplex II HPV28 Detection kit (Seegene), listet opp i Tabell 5. Hver av disse påviser tre HPV-genotyper i A-sett, og tre i B-sett. For å skille mellom de tre, er det benyttet catchere med ulike smeltepunktsprofiler. En med lavt smeltepunkt, en med middels smeltepunkt og en med høyt smeltepunkt. Internkontrollen, IC, påvises i både A- og B-sett, med fluoroforen quasar 670.

Tabell 5: Oversikt over fluoroforer benyttet i multiplex qPCR-analyse med Anyplex II HPV28 Detection kit, og hvilke HPV-genotyper som påvises med de ulike fluoroforene i A- og B-sett. Internkontroll (IC) påvises i både A- og B-sett (36).

Fluorofor	A-sett	B-sett
FAM	66, 45, 58	26, 69, 73
HEX	51, 59, 16	42, 82, 53
Cal Red 610	33, 39, 52	43, 54, 70
Quasar 670	IC, 35, 18	IC, 61, 6
Quasar 705	56, 68, 31	44, 40, 11

2.4 Prøveopparbeidelse

2.4.1 Isolering av DNA fra pasientprøver

DNA fra pasientprøvene ble isolert etter prosedyre «DNA-isolering av FFPE-vev, MolPat Lab» ved Avdeling for patologi på St. Olavs Hospital, EQS 23637 (Vedlegg 1) med lysering over natt. Deler av prosedyren ble utført fullautomatisert på QIAcube (Qiagen) etter prosedyre «QIAcube, bruk og vedlikehold, MolPat Lab» ved Avdeling for patologi på St. Olavs Hospital, EQS 28843 (Vedlegg 2). Brukerdefinert protokoll, «QIAamp DNA FFPE Tissue sections Custom», og standard elueringsvolum på 200µL ble valgt. Reagens og prøver ble plassert på

instrumentet etter instruksjoner på instrumentets skjerm og i prosedyren. Eluatene var klare etter en og en halv time på instrumentet.

Prøve 22-27 ble isolert av meg, resterende prøver ble isolert av ansatte ved Avdeling for patologi.

2.4.2 Måling av DNA-konsentrasjon

DNA-konsentrasjon i ekstraktene ble målt med Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) etter prosedyre «Måling av DNA-/RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab» ved Avdeling for patologi på St. Olavs Hospital, EQS 30176 (Vedlegg 3). Det ble benyttet reagenser fra dsDNA BR Assay kit (Invitrogen).

DNA og dsDNA Broad Range ble valgt på Qubit 2.0 Fluorometer. Før avlesning av prøver på instrumentet ble nye standarder lagt inn etter instruksjoner på instrument. Målt DNA-konsentrasjon på prøvene ble lagt inn i datasystemet Sympathy.

Prøve 22-27 ble målt av meg, resterende prøver ble målt av ansatte ved Avdeling for patologi.

2.5 Utførelse av analysen

PCR mastermix A ble tillaget ved blanding av 4X HPV28 A TOM (5 µL), EM1 (5 µL) og RNase-fritt vann (5 µL). PCR mastermix B ble tillaget ved blanding av 4X HPV28 B TOM (5 µL), EM1 (5 µL) og RNase-fritt vann (5 µL). For å sikre tilstrekkelig volum for allikvotering ble det tillaget PCR mastermix til alle reaksjoner i oppsettet og én reaksjon ekstra. For hver prøve ble det tilsatt PCR mastermix A (15 µL) i en brønn, og PCR mastermix B (15 µL) i en brønn.

I brønner med mastermix (15 µL) ble det tilsatt kontroll eller prøve (5 µL). I den første brønnen ble det tilsatt RNase-fritt vann som non-template kontroll, i de neste tre brønnene ble det tilsatt PC1, PC2 og PC3, deretter paralleller av hver prøve. I den siste brønnen ble det tilsatt DNA fra normalvev som negativ kontroll. Det ble benyttet samme oppsett for A-rekke som for B-rekke. Etter pipettering ble det satt optiske lokk på PCR-stripsene, som så ble sentrifugerte før analysering.

Analysen ble utført på CFX96TM Real-time PCR Detection system (Bio-Rad) med cyclic-CMTA deteksjon etter protokoll i Tabell 6 og et egendefinert plateoppsett som forklart over.

Tabell 6: Cyclic-CMTA qPCR-protokoll for analyse med Anyplex II HPV28 Detection Kit. Inneholder informasjon om steg, temperatur, varighet og antall sykluser. Fluorescens detekteres i steg 8, 14 og 20 (36).

Steg	Temperatur	Varighet	Antall sykluser
1	50 °C	4 min	
2	95 °C	15 min	
3	95 °C	30 sek	30
4	60 °C	1 min	
5	72 °C	30 sek	
6	GOTO 3, 29 ganger til		
7	55 °C	30 sek	
8	Smeltepunktanalyse 55 °C ~85 °C (5 s / 0.5 °C)		
9	95 °C	30 sek	10
10	60 °C	1 min	
11	72 °C	30 sek	
12	GOTO 9, 9 ganger til		
13	55 °C	30 sek	
14	Smeltepunktanalyse 55 °C ~85 °C (5 s / 0.5 °C)		
15	95 °C	30 sek	10
16	60 °C	1 min	
17	72 °C	30 sek	
18	GOTO 15, 9 ganger til		
19	55 °C	30 sek	
20	Smeltepunktanalyse 55 °C ~85 °C (5 s / 0.5 °C)		

2.6 Dataanalyse

Resultatene ble gjennomgått med faglig veileder i programmene CFX Manager (Bio-Rad) og Seegene Viewer (Seegene). CFX Manager viser bare smeltepunktskurver, derfor ble dataene fra CFX Manager eksportert til Seegene Viewer. I Seegene Viewer blir dataene bearbeidet og visualisert med smeltepunktskurver for hvert CMTA-punkt og resultattabell med CMTA-verdi for hver HPV genotype og IC i hver brønn, samt samlet resultat for hver brønn. Resultatene blir utgitt som +, ++ eller +++, avhengig av ved hvilke CMTA-punkt målsekvensen detekteres. Ved resultat + er målsekvensen bare detektert i tredje og siste CMTA-punkt, ved resultat ++ er

måsekvensen er detektert i andre og tredje CMTA-punkt, og ved resultat +++ er måsekvensen detektert i alle tre CMTA-punkter.

2.7 Undersøkelse av spesifisitet

Analysens spesifisitet ble undersøkt ved analyse av 15 prøver med kjent resultat (prøve 3-17) fra analyse ved Ahus med samme metode. Prøve 3, 4, 6, 8, 9 og 13 ble analysert av ansatt ved Avdeling for patologi før prosjektets oppstart.

2.8 Undersøkelse av positiv kontroll

Kontrollenes viruskonsentrasjon ble undersøkt ved å lage en fortynningsrekke av de positive kontrollene PC1, PC2 og PC3. Det ble laget syv fortynninger med kontrollmateriale og RNase fritt vann. En ufortynnet løsning av kontrollene, en 5x fortynning, en 10x fortynning, en 20x fortynning, en 100x fortynning, en 500x fortynning og en 1000x fortynning. Som en negativ kontroll ble det tilsatt DNA fra normalvev negativt for HPV (50 ng/ μ L) i alle fortynninger. Ufortynnede løsninger av de positive kontrollene ble også analysert i hvert analyseoppsett.

2.8.1 Tillaging av fortynningsrekke

Fortynningene ble laget ved å blande RNase fritt vann, DNA fra positiv kontroll og normalvev. For å holde en konstant DNA-konsentrasjon på 50 ng/ μ L fra normalvev, ble det i hver fortynning tilsatt 3 μ L DNA fra normalvev med en konsentrasjon på 16,6 ng/ μ L. I tillegg ble 2 μ L DNA av en fortynnet positiv kontroll tilsatt. Blandingsforholdet er vist i Tabell 7.

Tabell 7: Oversikt over mengde positiv kontroll og normalvev for tillaging av 5x, 10x, 20x, 100x, 500x og 1000x fortynninger av positiv kontroll med konstant konsentrasjon på 50 ng/ μ L normalvev i hver fortynning, Positiv kontroll fortynnes med RNase fritt vann for å lage 50%, 25%, 12,5%, 5%, 2,5% og 0,25% løsninger.

Ferdig fortynning	Positiv kontroll	Normalvev 16.6 ng/ μ L
5x	2 μ L 50% konsentrasjon	3 μ L
10x	2 μ L 25% konsentrasjon	3 μ L
20x	2 μ L 12.5% konsentrasjon	3 μ L
100x	2 μ L 5% konsentrasjon	3 μ L
500x	2 μ L 2.5% konsentrasjon	3 μ L
1000x	2 μ L 0.25% konsentrasjon	3 μ L

3.0 Resultat

Non-template kontroll er negativ i alle analyseoppsett utført under prosjektet. IC i PC1 er positiv i alle analyseoppsett utført under prosjektet. Analyse av prøve 3, 4, 6, 8, 9 og 13 ble utført av ansatt ved Avdeling for patologi før prosjektets oppstart.

3.1 Analyse av kjente prøver

Analysen ble utført etter beskrivelse i kapittel 2.5. Resultatene er vist i Tabell 8, rådata er vist i Tabell 12-14, Vedlegg 5. Positivt IC-resultat viser at humant DNA er til stede.

Prøve 11 er «invalid» siden IC er negativ og kvalitativ kvalitetskontroll derfor ikke godkjent. Prøve 5 har lav DNA-konsentrasjon og har ikke blitt positiv for HPV ved St. Olavs Hospital, men har resultat ++ på IC som viser at det er humant vev til stede i prøven.

Tabell 8: Resultater for prøve 3-17 analysert ved St. Olavs Hospital sammenlignet med tidligere funn med samme metode på Ahus. Tabellen viser også prøvenes DNA-konsentrasjon før analyse og mengden humant DNA detektert under analyse. Resultatene fra St. Olavs Hospital er semikvantitative, hvor +++ er mest virus-DNA og + er minst virus-DNA.

Prøve	DNA-input (ng/ μ L)	IC	Resultat St. Olav	Resultat Ahus	Risikotype
3	0,708	++	82 (++)	82	HR-HPV
4	8,36	+++	16 (++)	16	HR-HPV
5	<0,01	++	Negativ	44	LR-HPV
6	<0,01	++	6 (+++), 44 (+)	6; 44	LR-HPV
7	8,4	+++	16 (+++), 45 (+)	16	HR-HPV
8	10	++	18 (+), 70 (+++)	70	HR+LR-HPV
9	10	++	16 (++) , 53 (+)	16; 53	HR-HPV
10	10	+++	45 (++)	45	HR-HPV
11 ^a	<0,01	-/+	Invalid	18	-/HR-HPV
12	10	+++	18 (+++), 11 (+)	18	HR+LR-HPV
13	<0,01	++	18 (++)	18	HR-HPV
14	7,6	+++	16 (++) , 18 (+), 11 (+++)	11	HR+LR-HPV
15	10	+++	18 (++)	18	HR-HPV
16	0,464	++	6 (++)	6	LR-HPV
17	1,3	++	26 (++)	26; 53	HR-HPV

^a Tom blokk

3.2 Analyse av ukjente prøver

Analysen ble utført etter beskrivelse i kapittel 2.5. HPV genotype resultater for de ukjente prøvene 18-27 med konsentrasjon er vist i Tabell 9. Rådata er vist i Tabell 15 og 16, Vedlegg 5. Alle prøver er positive for minst én HPV genotype, prøve 26 er positiv for to HPV genotyper.

Tabell 9: Semikvantitative HPV-resultater for prøve 18-27. Disse prøvene hadde ukjent HPV-status før analyse. Tabellen viser også prøvenes DNA-konsentrasjon (ng/μL). Resultatene er semikvantitative, hvor +++ er mest virus-DNA og + er minst virus-DNA.

Prøve	DNA-input (ng/μL)	IC	Resultat	Risikotype
18	129	+++	16 (+++)	HR-HPV
19	21,4	+++	16 (+++)	HR-HPV
20	3,81	++	16 (++)	HR-HPV
21	22,5	+++	16 (+++)	HR-HPV
22	13	+++	16 (+++)	HR-HPV
23	6,48	+++	16 (++)	HR-HPV
24	6,72	+++	16 (++)	HR-HPV
25	6,32	+++	16 (+)	HR-HPV
26	9,4	+++	31 (+), 39 (+)	HR-HPV
27	9,64	+++	33 (++)	HR-HPV

3.3 Fortynningsrekke

Fortynninger ble laget etter beskrivelse i kapittel 2.8.1. Resultater er vist i Tabell 10. Til og med 10x fortynning er alle genotyper detektert ved alle tre CMTA-punkt. Ved 20x fortynning detekteres fire av genotypene bare ved de to siste CMTA-punktene. Ved 100x fortynning er 15 av genotypene bare detektert ved de to siste CMTA-punktene. Tre av genotypene er kun detektert ved alle CMTA-punktene i én av to analyserte paralleller. Ved 500x fortynning er det bare to genotyper som detekteres ved alle tre CMTA-punkter. En av genotypene detekteres bare i det siste CMTA-punktet, og en er ikke detektert ved noen CMTA-punkter i én av to analyserte paralleller. Ved 1000x fortynning er kun én av genotypene detektert ved alle tre CMTA-punkter, mens en genotype kun er detektert i én av to analyserte paralleller.

Ved 5x fortynning er IC ikke detektert i én av to analyserte paralleller.

Tabell 10: HPV genotype-resultater av PC1, PC2 og PC3 i ulike fortynninger. HPV genotype loddrett og fortynningsfaktor vannrett. Felt med to svar viser svar på analyserte paralleller, felt med ett svar har samme svar på analyserte paralleller.

+: detektert bare ved siste CMTA-punkt. ++: detektert ved de to siste CMTA-punktene. +++: detektert ved alle tre CMTA-punkter.

	1x	5x	10x	20x	100x	500x	1000x
A-sett							
16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
18	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
31	+++	+++	+++	+++	++	++	++
33	+++	+++	+++	+++	++	++	++
35	+++	+++	+++	++	++	++	++
39	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
45	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
51	+++	+++	+++	+++	+++/++	++	++
52	+++	+++	+++	++	++	-/+++	++
56	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
58	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
59	+++	+++	+++	+++	++	++	++
66	+++	+++	+++	+++	+++/++	++	++
68	+++	+++	+++	+++	++	++	++
IC	+++	+++/- ^a	+++	+++	+++	+++	+++
B-sett							
6	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
11	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
26	+++	+++	+++	+++	+++/++	++	++
40	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
42	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
43	+++	+++	+++	+++	++	++	++
44	+++	+++	+++	+++	++	++	++
53	+++	+++	+++	+++	++	++	++
54	+++	+++	+++	++	++	+	-/+
61	+++	+++	+++	++	++	++	++
69	+++	+++	+++	+++	++	++	++
70	+++	+++	+++	+++	++	++	++
73	+++	+++	+++	+++	++	++	++
82	+++	+++	+++	+++	++	++	++
IC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^a Ingen signal på IC i A-sett på parallell 2, pipetteringsfeil sannsynlig feilkilde.

4.0 Diskusjon

Hensikten med prosjektet var utprøving og validering av en kommersiell metode for væskebaserte prøver på FFPE-prøver hos pasienter med ukjent HPV-status. En viktig undersøkelse for pasienter med forstadium til kreft som ikke er tidligere testet for HPV-infeksjon, eller som har negativt svar på HPV-screening.

Det er detektert humant vev i minst to CMTA-punkter i alle prøver utenom prøve 11. Parafinblokken til prøve 11 så tilsynelatende tom ut da den ankom St. Olavs hospital og ble målt til $<0,01$ ng/ μ L, som kan bety at vevet i blokken er brukt opp ved isolering for analyse hos Ahus, og at det kun var spor av vev igjen ved isolering hos St. Olavs Hospital. Prøve 5, 6 og 13 hadde også målt DNA-konsentrasjon $<0,01$ ng/ μ L. Humant vev ble likevel detektert i to av tre CMTA-punkt. Non-template kontroll var negativ i alle analyseoppsett. Det er derfor ikke mistanke om kontaminering av reagenser eller carry-over. Dette styrkes av at negativ kontroll er negativ for alle genotyper. Positiv kontroll har forventet resultat, som tyder på at PCR-reaksjonen har gått som den skal. Dette styrkes av at negativ kontroll har positiv internkontroll.

Det er ikke samsvar mellom St. Olavs Hospital og Ahus på alle kjente prøver. Årsak til manglende virusdeteksjon hos St. Olavs Hospital eller Ahus kan være at ulike isolat av vevsblokken er analysert. Ulike deler av vevsblokken kan inneholde ulik mengde virus-DNA. Områder med mye normalvev i forhold til dysplasi i vevsblokken vil gi lavere virustiter i isolatet siden virus-DNA fortynnes av DNA fra normalvev. Det kan føre til at virus-DNA ikke detekteres. Det ser ikke ut til å være noen sammenheng mellom type vev i prøven og uoverensstemmelse mellom resultatene hos St. Olavs Hospital og Ahus.

Det er detektert HR-HPV i alle ukjente prøver. De ukjente prøvene gjenspeiler St. Olavs rutinevirksomhet for metoden. Siden prøvene er prøver med dysplasi som mistenkes å være HPV-relatert, er resultatet forventet.

Fortynningsrekken viser at de positive kontrollene er svært konsentrerte. Kontrollene kan fortynnes til 10x, og alle genotyper vil fremdeles detekteres i alle CMTA-punkter. Til og med

100x fortynning detekteres alle genotypene i minst to CMTA-punkter. Først ved 500x fortynning blir en parallell negativ for en genotype. Den andre parallellen har imidlertid detektert genotypen i to CMTA-punkt, likt som også begge paralleller ved 1000x fortynning. Det tyder på at parallellen uten detektert virus er falsk negativ. I 1000x fortynning er det bare én HPV genotype som ikke detekteres. Denne genotypen detekteres også i en av de to parallellene. Da det ikke ble fortynnet videre er det vanskelig å påvise en eventuell feilkilde som årsak til negativt resultat i én parallell. Deteksjon i kun ett CMTA-punkt ved 500x fortynning styrker mistanke om sann negativ parallell ved 1000x fortynning. Invalid internkontroll i en av parallellene for A-sett ved 5x fortynning tyder på pipetteringsfeil. Øvrige resultater samsvarer med den andre parallellen. Det mistenkes at normalvev ikke er tilsatt i aktuell brønn.

5.0 Konklusjon

Resultater på intern kontroll viser at prøven er sensitiv for prøver med lav DNA-konsentrasjon. Det er stort sett samsvar mellom resultat ved St. Olavs Hospital og Ahus. Siden isoleringen hos de to sykehusene ikke er utført helt likt, er resultatene ikke 100% sammenlignbare, og det er ikke uforventet med noe uoverensstemmelse. Positivt resultat på ukjente prøver viser at metoden fungerer i St. Olavs rutine. Analyse av fortynningsrekken viser at de positive kontrollene er svært konsentrerte. En urealistisk høy konsentrasjon i kontrollene gir falsk trygghet og økt risiko for kontaminering av øvrige prøver.

Anplex II HPV28 Detection kan benyttes for detektering av HPV genotype på FFPE-vev, men det vil være fordelaktig å fortynne positiv kontroll før bruk.

6.0 Referanser

1. WCRF. Cervical cancer statistics I World Cancer Research Fund International [Internett]. WCRF International. [sitert 9. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/cervical-cancer-statistics/>
2. Kreftforeningen. HPV, HPV-vaksine og kreft [Internett]. Kreftforeningen. 2023 [sitert 9. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/forebygging/hpv-og-kreft/>
3. Swiss Institute of Bioinformatics. Papillomaviridae ~ ViralZone [Internett]. ViralZone. 2010 [sitert 22. april 2023]. Tilgjengelig på: https://viralzone.expasy.org/5.html?outline=all_by_species
4. Rollad H, Müller F, Tønjum (red.) T. Medisinsk mikrobiologi. 4. utgave. Oslo: Gyldendal; 2019.
5. Kadaja M, Silla T, Ustav E, Ustav M. Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology*. 20. februar 2009;384(2):360–8.
6. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*. 1. oktober 2017;28(10):2386–98.
7. FHI. Humant papillomavirus (HPV), genitale infeksjoner [Internett]. Folkehelseinstituttet. 2010 [sitert 13. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/humant-papillomavirus-hpv-genitale-/>
8. Jonassen C, Christiansen IK, Tropé A. 2. Livmorhalskreft og Humant papillomavirus [Internett]. Krefregisteret. 2022 [sitert 13. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.krefregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/Faglig-Radgivningsgruppe/kvalitetsmanual2/2.-livmorhalskreft-og-humant-papillomavirus/>
9. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 8. september 2007;370(9590):890–907.
10. Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*. 20. februar 2021;13(2):321.
11. Pirami L, Giachè V, Beccioli A. Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol*. 1997;50(7):600–4.

12. Thørring J, Sørbye SW. Alt om HPV celleforandringer, livmorhalskreft, HPV-vaksine. Melhus: Cora forl; 2018.
13. FHI. Vaksine mot HPV (Humant papillomavirus) [Internett]. Folkehelseinstituttet. 2022 [sitert 27. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/vaksinasjon/barnevaksinasjonsprogrammet/hpv-vaksine/>
14. Silva M. Livmorhalskreft [Internett]. Krefregisteret. 2023 [sitert 16. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.krefregisteret.no/Temasider/kreftformer/Livmorhalskreft/>
15. Kreftforeningen. Livmorhalskreft [Internett]. Kreftforeningen. 2023 [sitert 16. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreftformer/livmorhalskreft/>
16. Helsedirektoratet. Gynekologisk kreft – handlingsprogram - Helsedirektoratet [Internett]. Helsedirektoratet. 2023 [sitert 9. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/gynekologisk-kreft-handlingsprogram>
17. Eide ML. Oppsummering/spørretime cytologi. 2022 mai 20.
18. Chang AR. Carcinoma in situ of the cervix and its malignant potential. A lesson from New Zealand. *Cytopathology*. 1990;1(6):321–8.
19. Kreftforeningen. Screening og masseundersøkelser [Internett]. Kreftforeningen. 2023 [sitert 17. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/forebygging/screening-og-masseundersokelser/>
20. Livmorhalsprogrammet – screening mot livmorhalskreft [Internett]. Kreftforeningen. 2023 [sitert 17. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/forebygging/screening-og-masseundersokelser/livmorhalsprogrammet/>
21. Krefregisteret. HPV i primærscreening [Internett]. Krefregisteret. 2022 [sitert 22. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.krefregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/screeningstrategi-og-nasjonale-retningslinjer/HPV-i-primarscreening/>
22. Kreftforeningen. Livmorhalsprøve (celleprøve og HPV-test fra livmorhalsen) [Internett]. Kreftforeningen. 2023 [sitert 17. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/undersokelser/livmorhalsprove-celleprove-av-livmorhalsen/>

23. Cox JT, Schiffman M, Solomon D, The ALTS (ALTS) G. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(6):1406–12.
 24. McPherson MJ, Møller SG. *PCR.* 2nd ed. New York: Taylor & Francis; 2006. 292 s. (The Basics).
 25. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 15. januar 2015;439:231–50.
 26. Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. Real-Time PCR – The Basic Principles. I: Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications [Internett]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009 [sitert 11. april 2023]. s. 27–46. Tilgjengelig på: https://link.springer.com/10.1007/978-90-481-3132-7_3
 27. Hoy MA. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. I: Insect Molecular Genetics [Internett]. Elsevier; 2013 [sitert 16. april 2023]. s. 307–72. Tilgjengelig på: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158740000081>
 28. Thermo Fisher Scientific. What is multiplexing? - NO [Internett]. Thermo Fisher. [sitert 16. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-multiplex-qpcr.html>
 29. Considerations for singleplex vs. multiplex qPCR--Taq Talk Episode 23 [Internett]. 2022 [sitert 16. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.youtube.com/watch?v=W4szQKdG66I>
 30. Seegene. TOCE Technology [Internett]. Seegene. [sitert 25. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.seegene.com/technologies/toce>
 31. Lee Ph.D DH. TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR. *Seegene Bull.* 1. juli 2012;1:5–10.
 32. Chun, Ph.D. JY. High Multiplex Molecular Diagnostics - Shifting the Diagnostics Paradigm. *Seegene Bull.* 1. juli 2012;1:1–4.
 33. Seegene. DPO Technology [Internett]. Seegene. [sitert 26. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.seegene.com/technologies/dpo>
-

34. Hwang, Ph.D IT. cyclic-CMTA: An Innovative Concept in Multiplex Quantification. *Seegene Bull.* 1. juli 2012;1:11–5.
35. Park KJ. Cervical adenocarcinoma: integration of HPV status, pattern of invasion, morphology and molecular markers into classification. *Histopathology.* januar 2020;76(1):112–27.
36. Seegene. Anyplex II HPV28 Detection Pakningsvedlegg V2.13. Seegene; 2022.

7.0 Vedlegg

Vedlegg 1: Utdrag av prosedyre for DNA-isolering fra FFPE-vev

Dokument «DNA-isolering FFPE vev, MolPat Lab», ID 23637 - EQS

DNA-isolering FFPE vev, MolPat Lab

Forfatter: Tone Furre

Gyldig fra: 09.07.2021

Revisjon: 1.11

Godkjent av: RPA Systembruker

Revisjonsfrist: 09.07.2023

ID: 23637

Hensikt og omfang

Isolere og rense DNA fra formalinfiksert, parafinnstøpt (FFPE) vev til PCR-baserte molekylærpatologiske analyser. Grunnlagsinformasjon, validering og referanser, se innledning.

En oversikt over isolering av DNA fra snitt dekket med dekkglass eller film, finnes i papirformat og er oppslått ved avtrekksskapet på FISH-laben, rom 232.04.021. Finn dokumentet under «relatert»: Isolering av DNA fra vevssnitt på objektglass.

Ansvar

Seksjonsleder, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avd. for patologi.

Arbeidsbeskrivelse

Proseduren utføres av

Opplært laboratoriepersonell ved Enhet for molekylærpatologi, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avd. for patologi.

Reagenser og utstyr

Vær obs på løsninger som er færemerket Δ , i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø. For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline.					
Varenavn	Færemking	Oppbevaring	Avfalls- håndtering	Artikkelnr.	Materialnr. (SAP)
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit - nærmere spesifisert under "innledning".	Δ	FISH-lab: rom 232.04.021 Isoleringslab: rom 232.05.024 FISH-lab og isoleringslab (QIAcube), romtemp. og kjøleskap - nærmere spesifisert under "innledning".	Se under "innledning" I praksis: alt avfall fra QIAcube (plast og reagensrester) kastes i lukket pose i risikoavfallsboks ved QIAcube.	QIAGEN, 56404	4013348 (lagerstyrt A114)

Buffer AW2 (concentrate, 324 ml) <i>Tillegg til buffer AW2 som følger med QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit.</i>		Isoleringslab (QIAcube), romtemp.		QIAGEN, 19072	4040831 (kort, FISH- lab)
Buffer AL Lysis Buffer <i>Tillegg til Buffer AL som følger med QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit.</i>	⚠	Isoleringslab (QIAcube), romtemp.		QIAGEN, 19075	4041794 (kort, FISH- lab)
Tissue-Clear®	⚠	Kjemikalie- skap "FLAMME"	Tømmes i avløp merket "TissueClear/Xylen/Alkohol" på rom 232.04.011		
Xylen	⚠	Kjemikalie- skap "FLAMME"	Tømmes i avløp merket "TissueClear/Xylen/Alkohol" på rom 232.04.011		
Absolutt alkohol prima (u/tilsetn.)	⚠	FISH-lab og spritskap	Tømmes i avløp merket "TissueClear/Xylen/Alkohol" på rom 232.04.011		4013080 (lagerstyrt A114))
Sterilt vann		FISH-lab			Hylleware på lageret
RNase A * (17,500 U)		FISH-lab		QIAGEN, 19101	4012076 (kort, FISH- lab)
Sample Tubes RB (2 ml)		FISH-lab		QIAGEN, 990381	4013210 (kort, FISH- lab)
Sterile Fine-Tip transfer pipetter		FISH-lab			4013282 (kort, FISH- lab)
RNaseZap™ Wipes	⚠	FISH-lab		AM9786	Hylleware på lageret
Aceton (til fjerning av film)	⚠	Biopsilab			Bestilles av biopsilab

*: RNase A kan sløyfes. Ikke kritisk for å utføre prosedyren.

Fremgangsmåte, isolering fra parafinblokk

Forberedelser:

Vask over knivholder, preparatnål, benk, pipetter etc. med en RNaseZap våtserviett. Bytt kniv eller til ubrukt område på kniven mellom hver blokk. Snitt max 2 blokker pr. kniv.

Bruk hansker under hele prosedyren (både for å beskytte prøven fra huden og fordi enkelte av reagensene (**Δ**) kan virke irriterende på huden).

Preparering av buffere

Buffer ATL

- sjekk om det er utfellinger. Om nødvendig, varm opp bufferen (f.eks i varmeskap på ca. 60°C eller på toppen av termomixeren).

Buffer AW1

- tilsett 25 ml abs.alkohol til flasken som inneholder 19 ml Buffer AW1 konsentrat. Rist flasken. Fortynningen er holdbar inntil 1 år.

Buffer AW2

- tilsett 30 ml abs.alkohol til flasken som inneholder 13 ml Buffer AW2. Rist flasken. Fortynningen er holdbar inntil 1 år.

Snitting av parafinblokker:

- | | |
|---|---|
| 1 | <ol style="list-style-type: none">a. Snitt først bort overflaten på parafinblokka.b. Skjær snitt, tykkelse $\geq 10 \mu\text{m}$ (max 80 μm totalt) og overfør til sentrifugerør (QIAGEN Sample Tubes RB 2 ml). Vurder vevstype og biopsistørrelse og bruk skjønn! Skjær bort så mye parafin som mulig. |
|---|---|

Avparafinering (utføres i avtrekksskap):

<p>2</p>	<p>a. Tilsett 1 ml Xylen (evt. Tissue Clear). Vortex kraftig i 10 sek. (prøvene kan godt stå en stund på xylen).</p> <p>b. Sentrifugér i 2 min. ved 13200 rpm.</p> <p>c. Pipettér forsiktig av Xylen (bruk fine-tip transfer pipette) uten å ødelegge den løse vevspelleten i bunnen av røret. La det evt. være igjen litt væske og sentrifugér på nytt.</p> <p>d. Gjenta punkt a - c.</p> <p>e. Tilsett 1 ml abs. alkohol, vortex (vasking av vevspellet).</p> <p>f. Sentrifugér i 2 min. ved 13200 rpm, fjern supernatant.</p> <p>g. Tilsett 1 ml abs. alkohol, vortex (vasking av vevspellet).</p> <p>h. Sentrifugér i 2 min. ved 13200 rpm, fjern supernatant.</p> <p>i. Sentrifugér eventuelt <u>en gang til</u> for å fjerne eventuelle rester av alkohol i prøven.</p> <p>j. Fjern supernatant. La røret stå åpent i romtemperatur (eller inntil 56°C på varmeblokk) til resten av alkoholen har fordampet fullstendig (vevet skal være så tørt at det kan løsnes fra veggen på røret).</p>
<p>3</p>	<p>a. Resuspendér pelleten i 180 µl Buffer ATL.</p> <p>b. Tilsett 20 µl Proteinase K. Vortex. Øk volumet (buffer ATL+ Proteinase K) om nødvendig (2-4x) for å få vevet til å flyte fritt i løsningen.</p> <p>c. Inkubér på termomixer ved 56°C i minst 1 time eller inntil prøvematerialet er fullstendig lysert (gjerne over natt). Termomixeren skal stå på resting, hastighet ca. 600-700 rpm.</p> <p>d. Ta av prøvene og la dem stå i romtemperatur mens termomixeren justeres til 90°C.</p> <p>e. Inkubér ved 90°C i 1 time (gjelder også for celleblokk). Vær nøye med tiden! For lang tid eller for høy temperatur i dette trinnet kan øke fragmenteringen av DNA.</p> <p>f. Hvis det er uoppløst vev i ekstraktet, fjern dette. Bruk f.eks. en fine-tip transfer pipette.</p> <p>g. La prøvene avkjøles på benken i ca. 5 min. Det skal jobbes videre med 200 µl av lysatet. Pipettér av eventuelt overskudd. Tilsett 2 µl RNase A*. Vortex lett.</p> <p><i>* RNase A forventes å bidra til å øke utbyttet av DNA i ekstraktet. Ikke kritisk punkt for utførelsen av prosedyren.</i></p>

Resten av prosedyren gjøres rutinemessig på QIAcube.

Følg prosedyren:

 [QIAcube, bruk og vedlikehold, MolPat Lab](#)

Velg protokollen: "FFPE tissue sections: Custom" på QIAcube.
(DNA_QIAampDNAFFPETissue_FFPETissuesections_Custom_ID3532_V1.qpf)

Alternativ til QIAcube/ manuell prosedyre:

4	<ol style="list-style-type: none">a. Tilsett 200 µl Buffer AL til prøven. Vortex kraftig. Tilsett 200 µl abs.alkohol. Vortex kraftig.b. Spinn ned. Overfør lysatet til en QIAamp MinElute kolonne (i et 2 ml oppsamlingsrør) og sentrifugør ved 8000 rpm i 1 min.c. DNAet sitter nå i membranen i kolonna. Plasser kolonna i et nytt oppsamlingsrør og kast det gamle. Tilsett 500 µl Buffer AW1 til kolonna og sentrifugør ved 8000 rpm i 1 min.d. Plasser kolonna i et nytt oppsamlingsrør og kast det gamle. Tilsett 500 µl Buffer AW2 til kolonna og sentrifugør ved 8000 rpm i 1 min.e. Plasser kolonna i et nytt oppsamlingsrør og kast det gamle. Tilsett 500 µl Buffer AW2 til kolonna og sentrifugør ved 8000 rpm i 1 min.f. Plasser kolonna i et nytt oppsamlingsrør og kast det gamle. Sentrifugør ved 13200 rpm i 3 min. for å tørke membranen fullstendig.g. Kast oppsamlingsrøret. Plasser kolonna i et ID-merket sentrifugerør. Tilsett 200 µl Buffer ATE i sentrum av membranen. La røret stå på benken i 5 min. Sentrifugør ved 13200 rpm i 1 min.
---	---

DNAet er nå rensset og fritt for proteiner, nukleaser og andre forurensninger. DNA-ekstraktene oppbevares i kjøleskap inntil de er ferdig analysert. Langtidslagring i fryser, ca. -20°C eller lavere.

Vedlegg 2: Utdrag av prosedyre for bruk av QIAcube i DNA-isolering fra FFPE-vev

Dokument «QIAcube, bruk og vedlikehold, MolPat Lab», ID 28843 - EQS

QIAcube, bruk og vedlikehold, MolPat Lab

Forfatter: Ksenia Samareva
Godkjent av: Gudrun Hovstein

Gyldig fra: 28.02.2022
Revisjonsfrist: 28.02.2024

Revisjon: 2.0
ID: 28843

Dokument «QIAcube, bruk og vedlikehold, MolPat Lab», ID 28843 - EQS

Hensikt og omfang

Prosedyren beskriver bruk av laboratorieinstrumentet QIAcube til fullautomatisert isolering og rensing av DNA og RNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt (FFPE) vev til PCR-baserte molekylærpatologiske analyser.

Grunnlagsinformasjon, validering og referanser, se innledning.

Ansvar

Seksjonsleder, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avdeling for patologi.

Arbeidsbeskrivelse

Prosedyren utføres av

Prosedyren utføres av opplært laboratoriepersonell ved Enhet for molekylærpatologi, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avdeling for patologi.

Fremgangsmåte

Slå på instrumentet. Velg riktig protokoll og juster elueringsvolum om nødvendig. Plasser reagens og prøver i instrumentet. Trykk start.

For å unngå kontaminering av reagens, er det viktig at lokk på reagensflaskene skrues av etter at prøvene er plassert i instrumentet og omvendt etter endt kjøring. Pass på å bytte hansker mellom håndtering av prøver og reagens.

Plassering av reagens:

For åpning av et nytt kit, se:


[RNA-isolering vev, MolPat Lab](#)

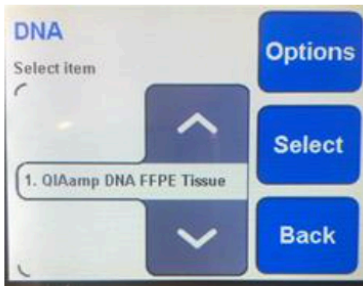
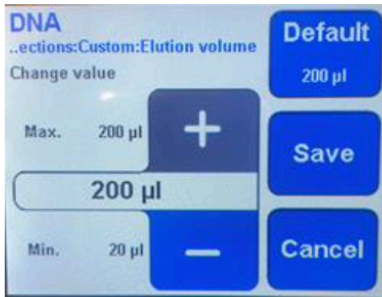
[DNA-isolering FFPE vev, MolPat Lab](#)

Reagenser fra kitet må tømmes over fra originalflasker til QIAcube reagensflasker. Skriv reagensenes lot-nummer på flaskene. Vær nøye med at reagensene settes i riktig posisjon i forhold til hvilken protokoll som kjøres. NB! Løkkene må skrues av før kjøring.

Bytt QIAcube reagensflasker ved hvert bytte av kit. For avfallshåndtering av reagenser, se prosedyren til kitet som er brukt. Tomme, brukte reagensflasker avfallssorteres som hardplast.

DNA
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit

<p>Reagensrack merket «DNA» i skapet over instrumentet. Reagensene oppbevares i RT.</p> <p>Posisjon 1: Tom Posisjon 2: Buffer AL Posisjon 3: Abs. alkohol Posisjon 4: Buffer AW1 Posisjon 5: Buffer AW2 Posisjon 6: Buffer ATE</p>	
---	--

<p style="text-align: center;">DNA QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit</p>	
<p>I rutinen brukes kundetilpasset protokoll fra Qiagen som heter «QIAamp DNA FFPE Tissue sections Custom», og er den eneste DNA-protokollen som er lagt inn på instrumentet.</p> <p>Protokollen inneholder ekstra vasketrinn med Buffer - AW2. Elueringsvolum 20 – 200 µl. Standard elueringsvolum er 200 µl.</p>	
<p>Trykk <DNA> på skjermen.</p> <p>Riktig protokoll kommer opp. Gå videre ved å trykke <Select>.</p>	
<p>For å endre elueringsvolum trykk <Edit> over startknappen. Velg ønsket elueringsvolum. Trykk <Save> og <Start>.</p> <p>Instrumentet vil nå sjekke bl.a. om det er nok reagens i flaskene og om det er nok pipettespisser til det antallet prøver som er satt inn. Ikke forlat instrumentet før denne sjekken er ferdig.</p> <p>Tid beregnes ut fra antallet prøver og kommer opp på skjermen ved protokollens start.</p>	

Grunnlagsinformasjon

QIAcube er et laboratorieinstrument designet for å utføre fullautomatisert rensing av nukleinsyrer og proteiner til molekylærbiologiske applikasjoner. QIAcube kan brukes sammen med flere ulike QIAGEN reagenskit.

Generell beskrivelse av instrumentet

QIAcube består av en sentrifuge, en oppvarmet ristepattform (heretter kalt shaker), et pipetteringssystem og en robotarm. QIAcube har flere ulike standardprotokoller integrert. Egendefinerte protokoller kan etterbestilles fra QIAGEN.

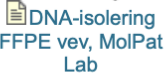

1. Prøvene lyseres FØR de settes på QIAcube (alternativ: på QIAcube, i shakeren som kan programmeres til å varme opp prøvene. Se brukermanualen, kap.5.7).
2. Hvert lysat transporteres til en spinnkolonne som er plassert i en rotoradapter i sentrifugen.
3. Nukleinsyrer eller proteiner bindes til membranen i kolonnen og gjennomgår gjentatte vasketrinn.
4. Spinnkolonnen transporteres til et elueringsrør før eluering.

Se for øvrig brukermanualen, kapittel 3.

Reagenser og utstyr

Navn	Reg. nr (Med.tek utstyr)	Rom	Type	Leverandør
Qiacube	48429	232.05.024	Qiacube	QIAGEN

Vær obs på løsninger som er faremerket **Δ**, i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø.
For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline.

Varenavn	Faremerking	Oppbevaring FISH-lab: rom 232.04.021 Isoleringslab: rom 232.05.024	Avfallshåndtering	Artikkelnr.	Materialnr. (SAP)
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit Se under «innledning» 	Δ	FISH-lab og isoleringslab (QIAcube), romtemp. og kjøleskap	*	QIAGEN, 56404	4013348 (lagerstyrt A114)
RNeasy FFPE Kit Se under «innledning» 	Δ	FISH-lab og isoleringslab (QIAcube), romtemp. og kjøleskap og fryser	*	QIAGEN, 73504	4013101 (lagerstyrt A114)
Sample Tubes RB (2 ml)		FISH-lab	*	QIAGEN, 990381	4013210 (lagerstyrt A131)

Rotor Adapters (10 x 24) Inkludert 240 stk. Elution Tubes (1,5 ml)		FISH-lab og isoleringslab	*	QIAGEN, 990394	4013209 (lagerstyrt A131)
Filter-tips, 1000 µl (1024)		Isoleringslab	*	QIAGEN, 990352	4048869 (lagerstyrt A131)
Reagent Bottles, 30 ml (6)		Isoleringslab	Restavfall	QIAGEN, 990393	4013208 (lagerstyrt A131)
Evt. andre forbruksvarer til QIAcube, se brukermanualen Appendix C					
Sterilt vann		Ved instrumentet			Hyllevare 4. og 5.etg.
Våtservietter, RNaseZap™ Wipes	Δ	Ved instrumentet	Restavfall	Invitrogen, AM9786	Hyllevare 4.etg.
Kimwipes papirservietter (støvfritt papir)		Ved instrumentet	Restavfall		4013347 (lagerstyrt medgen A119)

* I praksis: alt avfall fra QIAcube (plast og reagensrester) kastes i lukket pose i risikoavfallsboks ved QIAcube.

Validering

Instrumentet er validert av overingeniør Hong Yan Dai. Valideringsrapport mangler i EQS. Fullautomatisert RNA-protokoll ble tatt i bruk januar 2022, se valideringsrapport [Validering - RNeasy FFPE Kit på QIAcube](#)

Referanser

QIAcube® User Manual, versjon 1.3, 03/2018

Brukermanualen finnes i perm merket «QIAcube» ved instrumentet og som vedlegg under «relatert».

Relaterte dokumenter:

[DNA-isolering FFPE vev, MolPat Lab](#)

[RNA-isolering vev, MolPat Lab](#)

[Validering - RNeasy FFPE Kit på QIAcube](#)

Relaterte vedlegg:

[QIAcube User Manual versjon 1.3 03/2018](#)

[Vedlikeholdsskjema QIAcube](#)

Vedlegg 3: Utdrag av prosedyre for måling av DNA-konsentrasjon med Qubit 2.0

Dokument «Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab», ID 30176 - EQS

Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab

Forfatter: Ingeborg Engesvold, Tone Furre
Godkjent av: RPA Systembruker

Gyldig fra: 09.02.2021
Revisjonsfrist: 09.02.2023

Revisjon: 1.6
ID: 30176

Frist for revisjon av dette dokumentet er passert.

Hensikt og omfang

Måle konsentrasjon av dobbeltrådet DNA (dsDNA) og RNA i ekstrakter fra formalinfiksert parafininnstøpt vev. Grunnlagsinformasjon referanser, se under «innledning».

Validering

Se valideringsrapporter:

 [Valideringsrapport; Qubit 2.0 Fluorometer og Qubit dsDNA BR Assay Kit, MolPat Lab](#)

 [Valideringsrapport - Qubit RNA HS Assay Kit, MolPat Lab](#)

Validering Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® RNA HS Assay Kit

Målemetoden er den samme for disse kitene som for Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® RNA HS Assay Kit. Det er kun måleområdet som er forskjellig. Det er derfor tilstrekkelig å henvise til validering av Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® RNA HS Assay Kit som viste at bruk av Qubit® Fluorometer er en bedre metode å måle DNA- og RNA-konsentrasjon enn å måle med Nanodrop.

Risikovurdering

Alle reagenser er risikovurdert i EcoOnline med resultat «grønt», dvs det kan jobbes på benk med alle kitene.

NB! Ny versjon av databladet for Qubit® dsDNA BR Reagent *200X concentrate in DMSO* foreligger og reagentset er risikovurdert på nytt, (nov-18).

Ansvar

Seksjonsleder ved Seksjon for spesialundersøkelser i patologi, Avdeling for patologi, har det overordnede ansvar for oppgaven.

Arbeidsbeskrivelse

Prosedyren gjelder for opplært laboratoriepersonell ved Enhet for molekylærpatologi, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avdeling for patologi.

Instrument

Qubit® 2.0 Fluorometer (rom 232.05.024)

Reagenser og utstyr

Varenavn	Fare-merking	Oppbevaring	Avfalls-håndtering	Artikkelnr.	Materialnr. (SAP)/bestilling
		FISH-lab: rom 232.04.021			

Qubit® dsDNA BR Assay Kit -nærmere spesifisert under "innledning".		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap -nærmere spesifisert under «innledning».	Se under «innledning»	Invitrogen, Q32853	Matrialnr: 4012075 (kort)
Qubit® dsDNA HS Assay Kit		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap -nærmere spesifisert under «innledning»	Se under «innledning»	Invitrogen Q32854	Matrialnr: 4022024 (kort)
Qubit® RNA HS Assay Kit		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap -nærmere spesifisert under «innledning»	Se under «innledning»	Invitrogen Q32852	Matrialnr (kort)
Qubit® RNA BR Assay Kit -nærmere spesifisert under "innledning".		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap -nærmere spesifisert under «innledning».	Se under «innledning»	Invitrogen, Q10210	Matrialnr: 4019906 (kort)
Qubit® assay tubes (500 tubes)		FISH-lab, skuff 6.		Invitrogen, Q32856	573336 (FISH-lab)
Rør for å mikse Qubit arbeidsløsning, for eksempel disse: 5 mL Microtube. RNase, DNase & Pyrogen Free (200/PK)		FISH-lab, skuff 6.		Argos Technologies, T2080A	573342 (FISH-lab)

Fremgangsmåte

DNA

Velg dsDNA BR Assay kit eller dsDNA HS Assay kit. I rutinen brukes BR-kit.

1. Sett opp riktig antall 0,5-mL rør for standarder og prøver og merk rørene. NB! Kun originalrør (Invitrogen, Q32856) kan brukes.
2. Lag arbeidsløsning ved å fortynne **Qubit® dsDNA BR reagent/ Qubit® dsDNA HS reagent** 1:200 med **Qubit® dsDNA BR buffer/ Qubit® dsDNA HS buffer**:
Bruk et 5 ml mikrorør. Lag 200 µL arbeidsløsning for hver standard og hver prøve.

Qubit® dsDNA BR reagent/ Qubit® dsDNA HS reagent: 1 x n µL
Qubit® dsDNA BR buffer/ Qubit® dsDNA HS buffer: 199 x n µL

Tips: lag arbeidsløsning til 1 prøve ekstra (n + 1) for å sikre at det blir nok løsning uten bobler.
3. Tilsett 190 µL arbeidsløsning til hvert av standardrørene og rør 195 µL arbeidsløsning til hvert av prøve-rørene.
4. Tilsett 10 µL av *hver* **Qubit® dsDNA BR standard/ Qubit® dsDNA HS standard** (#1 og #2) til respektive rør med arbeidsløsning. Vortex 2-3 sek., unngå bobler. Spinn ned.
5. Tilsett 5 µL av hver prøve til respektive rør med arbeidsløsning. Vortex 2-3 sek., unngå bobler. Spinn ned.
6. Inkubør rørene i minst 2 min. på benk (maks. 3 timer).

Avlesning på fluorometer ved DNA-måling

Standarder og prøver skal ha romtemperatur ved måling.

Slå på fluorometeret, velg <DNA> og deretter <dsDNA Broad Range>.

Read new standards? <Yes>

Sett inn standard 1, <Read>

Sett inn standard 2, <Read>

Sett inn prøve 1, <Read>

Velg <calculate stock conc.> og les av konsentrasjon i <ng/µL>

Velg «Volume og sample used»: <5 µL>

Velg <Read next sample> og fortsett på samme måte til alle prøvene er avlest.

Måling med Qubit® dsDNA BR Assay Kit:

Målinger >200 ng/µl (ved tilsetning av 5ul prøve er utenfor standardkurven (5x200 ng/ul =1000ng)), og må regnes som usikre. Fortynn eller tilsett mindre prøve og mål på nytt, slik at konsentrasjonen blir <1000 ng totalt i løsningen.

Måling med Qubit® dsDNA HS Assay Kit:

Målinger >20 ng/µl (ved tilsetning av 5ul prøve) er utenfor standardkurven (5x20ng/ul=100 ng) og må regnes som usikre. Fortynn prøven eller tilsett mindre prøve og mål på nytt, slik at

4/8

Registrering i Sympathy

Skriv inn DNA- eller RNA-konsentrasjon i noteringsfeltet til analysekoden <ISOL>. Hvis ekstraktet er misfarget (gult/brunt), skriv en kommentar om dette i samme noteringsfelt. Legg inn kommentar hvis prøven er fortynnet og målt på nytt, (jfr punktene *Måling medAssay Kit*)

Grunnlagsinformasjon

Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® dsDNA HS Assay Kit

Qubit® dsDNA BR (Broad-Range) Assay Kit og Qubit® dsDNA HS (High Sensitive) Assay Kit kvantiterer DNA enkelt og nøyaktig. Kitet inneholder konsentrert reagens, fortynningsbuffer og ferdigfortynnede standarder. Metoden selekterer dobbeltrådet DNA (dsDNA) og er gir nøyaktig konsentrasjon i området 100 pg/µL – 1000 ng/µl for *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* og 10pg/µL- 100 ng/µl for *Qubit® dsDNA HS Assay Kit*

Analysen skal utføres ved romtemperatur, - en prøve som skal måles på nytt bør taes ut av instrumentet og stå på benk i 30 sek., før den måles på nytt. Signalene er stabile i 3 timer (1).

Reagenser i kitene

Ingen av løsningsene som er faremerket **Δ**, i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø.
For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline. (Logg inn med firmakode 71)

Dokument «Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab», ID 30176 - EQS

Varenavn	Faremerking	Oppbevaring	Avfalls- håndtering
Qubit® dsDNA BR reagent (Component A), 1.25 mL 200X konsentrat i DMSO		FISH-lab, skuff (RT*, beskyttet mot lys) FISH-lab: rom 232.04.021 Isoleringslab: rom 232.05.024	Kast rørene med fortynnet reagens i risikoavfallsboks på isoleringslaben.
Qubit® dsDNA BR buffer (Component B), 250 mL		FISH-lab, skuff (RT*)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA BR standard #1 (Component C), 5 mL 0 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA BR standard #2 (Component D), 5 mL 100 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA HS reagent (Component A), 1.25 mL 200X konsentrat i DMSO		FISH-lab, skuff (RT*, beskyttet mot lys)	Kast rørene med fortynnet reagens i risikoavfallsboks på isoleringslaben.
Qubit® dsDNA HS buffer (Component B), 250 mL		FISH-lab, skuff (RT*)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA HS standard #1 (Component C), 5 mL 0 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA HS standard #2 (Component D), 5 mL 10 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.

*: romtemperatur

Referanse

1: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»:
Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® dsDNA BR Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q32850, Q32853, 16.Februar 2015.

2: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»:
Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® RNA HS Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q32852, Q32855, 16.Februar 2015.

3: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»:

7/8


Dokument «Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab», ID 30176 - EQS

Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® dsDNA HS Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q32851, Q32854, 16.Februar 2015

4: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»:
Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® dsRNA BR Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q10210, Q10211, 16.Februar 2015

Relaterte dokumenter:

 [Valideringsrapport - Qubit RNA HS Assay Kit, MolPat Lab](#)

 [Valideringsrapport; Qubit 2.0 Fluorometer og Qubit dsDNA BR Assay Kit, MolPat Lab](#)

Relaterte vedlegg:

 [Userguide: Qubit dsDNA BR Assay Kits](#)

 [Userguide: Qubit RNA HS Assay Kits](#)

 [Userguide: Qubit RNA BR Assay Kit](#)

 [Userguide: Qubit dsDNA HS Assay Kit](#)

Vedlegg 4: Målt DNA-konsentrasjon i pasientprøver

Måling av prøve 22-27 ble utført av meg, resterende prøver ble målt av ansatte ved Avdeling for patologi. Alle prøver med DNA-konsentrasjon >10 ng/ μ L ble fortynnet til 10 ng/ μ L med RNase-fritt vann før analyse. Det ble ikke utført ny måling etter fortynning.

Tabell 11: Målt DNA-konsentrasjon (ng/ μ L) i isolerte prøver 1-27. Prøve nummer 11 er en tom parafinblokk, hvor prøvematerialet trolig er brukt opp før St. Olavs Hospital mottok prøven.

Prøvenr.	DNA-konsentrasjon (ng/ μ L)	Prøvenr.	DNA-konsentrasjon (ng/ μ L)
1	35,5	15	18,5
2	35	16	0,464
3	0,708	17	1,3
4	8,36	18	129
5	$<0,01$	19	21,4
6	$<0,01$	20	3,81
7	8,4	21	22,5
8	28,9	22	13
9	29,5	23	6,48
10	56,0	24	6,72
11 ^a	$<0,01$	25	6,32
12	21,7	26	9,4
13	$<0,01$	27	9,64
14	7,6		

^a Tom blokk

Vedlegg 5: Rådata fra analyse av pasientprøver

Tabell 12 Resultater HPV-analyse 20.03.2023

	HPV-genotype																				IC								
	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	69	73	82	6		11	40	42	43	44	54	61	70
NTC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC1	-	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-
PC2	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-
PC3	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
15		++																											+++
15		++																											+++

Tabell 13:Resultater HPV-analyse 21.03.2023

	HPV-genotype																				IC								
	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	69	73	82	6		11	40	42	43	44	54	61	70
NTC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC1	-	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-
PC2	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-
PC3	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
7	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
7	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
10	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
10	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
12	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+++
12	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+++
14	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
14	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

Tabell 14:Resultater HPV-analyse 22.03.2023

	HPV-genotype																				IC								
	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	69	73	82	6		11	40	42	43	44	54	61	70
NTC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC1	-	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-
PC2	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-
PC3	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
17	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

Tabell 15: Resultater HPV-analyse 28.03.2023

	HPV-genotype																								IC				
	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	69	73	82	6	11	40	42	43		44	54	61	70
NTC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC1	-	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++
PC2	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-
PC3	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
18	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
18	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
19	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
19	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
20	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
20	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
21	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
21	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

Tabell 16: Resultater HPV-analyse 29.03.2023

	HPV-genotype																								IC				
	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	69	73	82	6	11	40	42	43		44	54	61	70
NTC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC1	-	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++
PC2	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-
PC3	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
22	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
22	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
23	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
23	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
24	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
24	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
26	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
26	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
27	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
27	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

