




## VisionArray HPV PreCise Master Mix

REF ES-0007-50  50 testů

Pro amplifikaci HPV specifických sekvencí



Pro *in vitro* diagnostické zdravotnické zařazení  
podle směrnice 98/79/EC

### 1. Doporučené použití

VisionArray HPV PreCise Master Mix je určen k amplifikaci a biotinylní specifikých úseků oblasti L1 genomu lidského papilomaviru (HPV) polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).

VisionArray HPV PreCise Master Mix je navržen k amplifikaci HPV typů, mimo jiné včetně těch detekovaných odpovídajícími VisionArray HPV Chips a genomových sekvencí lidského genu HLA-DQA1 jako PCR pozitivní kontroly.

VisionArray HPV PreCise Master Mix musí být použit s VisionArray Detection Kit a odpovídajícími VisionArray HPV Chips. Automatizovanou analýzu je třeba provést pomocí balíčku VisionArray Software.

Tento produkt je určen pro diagnostické použití *in vitro* (podle směrnice EU 98/79/ES). Interpretace výsledků musí být provedena v kontextu klinické anamnézy pacienta s ohledem na další klinické a patologické údaje o pacientovi kvalifikovaným patologem.

### 2. Klinický význam

Viz pokyny pro použití příslušného čipu.

### 3. Princip testu

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) lze selektivně amplifikovat sekvence DNA. Základní princip PCR je založen na opakujícím se kruhu 3 kroků: denaturace, žhání a prodloužení. Opakování těchto kroků vede k exponenciálnímu zesílení cílových sekvencí.

Prvním krokem každého cyklu je denaturace, kdy ohřev reakční směsi vede k jednotlivým řetězcům DNA. Během žhání se komplementární primery váží na jednovláknovou DNA. Primery lemují cílovou sekvenci a slouží jako výchozí bod pro integraci nukleotidů během fáze prodloužení a vytvářejí identické kopie templátové DNA. Primery použité v této soupravě jsou označeny molekulou biotinu. Každý nový produkt PCR je tedy automaticky biotinylován, což později umožňuje detekci protilátek.

VisionArray HPV PreCise Master Mix je zdokonalením systému GP5 / GP6 (Snijders et al., 1990) a je namířen proti genu L1, vysoce konzervativní oblasti genomu HPV. V závislosti na genotypu HPV vede amplifikace k produktům PCR o délce fragmentu 139-148 bp.

Primery proti lidskému genu HLA-DQA1 jsou doporučovány WHO jako pozitivní kontrola v jejich laboratorních příručkách k lidskému papilomaviru, a jsou proto také zahrnuty do VisionArray HPV Master Mix PreCise.

Aby se zabránilo kontaminaci produkty amplifikace PCR, jsou do hlavní směsi VisionArray HPV PreCise Master Mix zahrnuty uracil nukleotidy. Provedením kroku Uracil-DNA-glykosyláza před PCR mohou být odstraněny všechny sekvence, které obsahují báze uracilu, a tudíž možné kontaminace produkty PCR z předchozích PCR VisionArray. Uracil-DNA-glykosyláza je inaktivována při teplotách nad 95 °C, takže PCR reakci lze provádět obvyklým způsobem.

### 4. Dodané reagentie

VisionArray HPV PreCise Master Mix se skládá:

- VisionArray HPV Primer
- PreCise Taq DNA Polymeráza
- Uracil-DNA Glykosyláza
- H<sub>2</sub>O
- MgCl<sub>2</sub>
- PCR-pufr
- dNTP/dUTP Roztok

VisionArray HPV PreCise Master Mix je dostupný v jedné velikosti:

- ES-0007-50: 0.75 ml (50 reakcí po 15 μl)

### 5. Požadovaný materiál, který není součástí

**Reagentie:**

- H<sub>2</sub>O (PCR-stupeň)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

**Doplňující příslušenství:**

- PCR doplňky
- Termocykler
- Pipety
- VisionArray HPV Chips (VA-0001; VA-0002)
- VisionArray SingleScan Software (E-4301) nebo VisionArray MultiScan Software (E-4302)

### 6. Skladování a zacházení

VisionArray HPV PreCise Master Mix musí být skladován při -16 až -22 °C ve svislé poloze.

Při dodržení těchto podmínek skladování bude produkt fungovat, aniž by došlo ke ztrátě výkonu, alespoň do data expirace uvedeného na štítku.

Minimalizujte počet cyklů zmrazení a rozmrazení na maximálně 10 cyklů uložením do pracovních alikotů. Po otevření lahvičky použijte zařazení do 6 měsíců.

Časové období produktu PCR při pokojové teplotě by mělo být co nejkratší.

### 7. Varování a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Činidla nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti!
- Vyhněte se jakékoli křížové kontaminaci a mikrobakteriální kontaminaci reagentií.
- Nikdy nepipetujte roztok ústy!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
- Aby se zabránilo kontaminaci, je nutné oddělení pracovních kroků s DNA a bez DNA a použití čistých stolů pro přípravu hlavní směsi PCR. avoid contaminations.

## 8. Omezení

- Pro diagnostické použití in vitro.
- Pouze pro profesionální použití.
- Interpretace výsledků musí být provedena v kontextu klinické anamnézy pacienta s ohledem na další klinické a patologické údaje kvalifikovaným patologem.
- Je důležité používat uvedená množství složek, aby nedošlo k narušení reakčního procesu.
- Opakované rozmrazování a zmrazování vzorků DNA může vést ke zhoršení detekční reakce.reaction.

## 9. Interferující látky

- Nízká účinnost PCR v důsledku inhibice PCR v surovině DNA (např. v krvi).
- Vysoké koncentrace EDTA v elučních pufrch mohou vést k inhibici PCR. Používejte pouze doporučené množství DNA.

## 10. Příprava zpracování vzorků

Jako výchozí materiál pro genotypizaci HPV lze použít formálně fixované, parafinem zalité vzorky (FFPE), vzorky z cervikálních výtěrů / štetců a ThinPrep vzorky.

Po extrakci je nutné měřit koncentraci DNA, aby se zkontrolovala kvalita a množství DNA. Každý vzorek by měl mít koncentraci DNA alespoň 15 ng /  $\mu$ l s vysokým stupněm čistoty (260/280: ~ 1,8).

Během extrakce se vyhněte kontaminaci DNA. Při použití mikrotomu by tkáňové řezy měly být po řezání okamžitě umístěny do reakční zkumavky. Čepel mikrotomu by měla být vyměněna mezi různými vzorky tkáně. Totéž platí pro již fixované vzorky tkáně namontované na skleněných sklíčkách. Škrabka by měla být mezi různými vzorky vyměněna.

## 11. Příprava pro zacházení s příslušenstvím

Jako první krok určete množství požadovaných PCR (n), které vychází z množství vzorků DNA plus negativní kontroly (reakční směs bez templátu DNA).

### Pipetující schéma:

Č.	Reagencie	1x (finální konc.)	nx
1	VisionArray HPV PreCise Master Mix	15 $\mu$ l (1x)	
2	Vzorek DNA	2.5-5 $\mu$ l	
3	H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l	
	<b>Celkový objem</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	

- Alikvotujte VisionArray HPV PreCise Master Mix do lahvíček pro PCR bez DNA / DNázy.
- Pipetujte DNA vzorku do Master Mixu (č. 2 v pipetovacím schématu). Pro negativní kontrolu přidejte 10  $\mu$ l vody bez DNA / DNázy.
- Je-li to nutné, přidejte vodu, abyste dosáhli konečného reakčního objemu 25  $\mu$ l (č. 3 v pipetovacím schématu).
- Přeneste vzorky do předehřátého a kalibrovaného termocykleru.cycler.

## 12. Postup analýzy

Amplifikační protokol popsán v této příručce byl vytvořen v 0,2 ml lahvíčkách PCR s použitím doporučených enzymů na systému Biometra TProfessional Thermocycler System. Je-li to nutné, mohou být úpravy podle výrobce provedeny při použití jiných tepelných cyklovačů. Tento protokol proto musí být před použitím otestován na kompatibilitu. Použitý termocykler musí být kalibrován podle pokynů výrobce.

### Teplotní profil:

Čas	Teplota	Opakování	Krok
10 min	25°C	x1	Inkubace Uracil-DNA Glykosylázy
10 min	95°C	x1	Aktivace HotStart Taq Polymerázy, Deaktivace Uracil-DNA Glykosylázy
20 s	95°C	x10	Denaturace
30 s	55°C		Annealing
80 s	60°C		Elongace
20 s	95°C	x35	Denaturace
30 s	38°C		Annealing
80 s	60°C		Elongace
1 min	95°C	x1	Denaturace
$\infty$	8°C	x1	

Ramping time:  $\Delta$  5°C/s

The thermal profile is optimised for the reagents recommended in this manual. Changes in the chemical composition or set up have to be validated by the user prior to use. Once the PCR has finished, the reaction vial should be stored at -16°C...-22°C.

## 13. Interpretace výsledků

VisionArray HPV PreCise Master Mix je určen k použití s VisionArray HPV Chip a VisionArray Detection Kit. Interpretace výsledků musí být provedena pomocí příslušného analytického VisionArray Software.

## 14. Doporučená kvalita control procedures

Aby bylo možné sledovat správnou výkonnost zpracovaných vzorků a testovacích činidel, každý test by měl být doprovázen externími validovanými pozitivními a negativními kontrolními vzorky. Pokud interní a/nebo externí kontrola neprokáže vhodné barvení, musí být výsledky u patientských vzorků považovány za neplatné.

Řízení PCR a amplifikací lze provést poté separací v elektroforéze na agarózovém gelu. Délka fragmentu typů HPV je přibližně 140 bp a je přítomna pouze ve vzorku pozitivním na HPV. Pozitivní kontrola ukazuje pás při 227 bp.

Vzhledem k nízké teplotě žhání a podmínkám PCR, které upřesňují jednovláknové produkty, nejsou jasně ohraničené pásy přítomny v každém testu. Úspěšná hybridizace čipu je však stále možná. Pouze úplná nepřítomnost pásu v gelu naznačuje neúspěšnou PCR. Další podrobnosti najdete v části řešení problémů.

## 15. Charakteristika provedení

Prostudujte si výkonnostní charakteristiky příslušného čipu VisionArray HPV Chip.

## 16. Likvidace

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

## 17. Řešení problémů

Jakákoli odchylka od návodu k použití může vést ke zhoršení detekční reakce cílové sekvence.

Problém	Možná příčina	Řešení
Chybějící nebo malý produkt amplifikace	Expirovaná nebo degenerovaná reakční činidla PCR; špatný program termocykleru.	Zkontrolujte PCR reagenty a program termálního cyklu.
	Degradovaná templátová DNA; nízký výtěžek DNA.	Uložte DNA na -16 -20 ° C; vyhnout se opakovanému rozmrazování a zmrazování; použít alternativní extrakční protokol.
	Inhibitory PCR v reakční směsi.	Použijte alternativní extrakční protokol.
PCR amplifikáty v negativní kontrole.	Kontaminace reagentů během přípravy vzorku nebo v nastavení PCR.	Použijte čerstvé reagenty; zamezte kontaminaci vzorků.

## 18. Literatura

- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 100, 2012; ISBN 978 92 832 1319 2
- WHO Human Papillomavirus Laboratory Manual, First edition, 2009.
- Snijders P. J. F., et al. (1990) *Journal of General Virology* **71**:173-181.

Naši odborníci jsou k dispozici pro zodpovězení vašich otázek. Kontaktujte [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Germany  
Phone: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ochranná známka:**  
VisionArray® je pod ochrannou známkou  
ZytoVision GmbH