



## VisionArray HPV High Risk Chip 1.0

<b>REF</b>	VA-0002-10	$\Sigma$	10 Reaktionen
<b>REF</b>	VA-0002-50	$\Sigma$	50 Reaktionen

Für den spezifischen Nachweis von 24 humanen Papilloma-Virus (HPV) Typen, welche mit dem VisionArray HPV PreCise Master Mix aufbereitet wurden



In-vitro-Diagnostikum  
gemäß EU Richtlinie 98/79/EC

### 1. Verwendungszweck

Der VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 ist in Kombination mit dem VisionArray Analysis Package für den qualitativen Nachweis und die Genotypisierung von PCR-Amplifikaten von 24 klinisch relevanten humanen Papilloma-Virus (HPV) High Risk und probably High Risk Genotypen, welche mit dem VisionArray HPV PreCise Master Mix aufbereitet wurden, bestimmt.

Dieses Produkt wurde für den Einsatz als In-vitro-Diagnostikum (gemäß EU-Richtlinie 98/79/EC) konzipiert. Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

### 2. Klinische Relevanz

Infektionen mit HPV sind weit verbreitet und ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von z.B. Zervixkarzinomen. Derzeit werden mehr als 150 verschiedene HPV-Typen beschrieben. Auf Grundlage des Risikos, Karzinome zu verursachen, werden sie in die Typen Low Risk (LR), probably High Risk und High Risk (HR) unterteilt.

Der VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 wurde für den Nachweis der folgenden 24 High Risk und probably High Risk Genotypen entwickelt:

#### Klassifikation der 24 HPV Genotypen auf dem VisionArray HPV High Risk Chip 1.0

High Risk	Probably High Risk
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	26, 34, 53, 66, 67, 68a, 68b, 69, 70, 73, 82IS39, 82MM4

Die HPV-Typen wurden nach den Angaben aus der aktuellen wissenschaftlichen Literatur klassifiziert.

### 3. Prinzip der Methode

Sequenzspezifische DNA-Fragmente in einem Pool von DNA-Fragmenten werden durch DNA/DNA-Hybridisierung mit immobilisierten DNA-Fängern auf einem Glaschip nachgewiesen. Zunächst werden die Zielsequenzen in diesem Material mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Biotinmolekülen markiert. Anschließend hybridisieren die amplifizierten Sequenzen mit den komplementären DNA-Fängern auf dem Glaschip. Nach der Hybridisierung werden unspezifisch gebundene DNA-Fragmente durch kurze Stringenzwaschschritte entfernt. Die spezifisch gebundenen und biotinylierten Sequenzen werden durch eine sekundäre Bindung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und einer Färbung mit Tetramethylbenzidin (TMB) visualisiert.

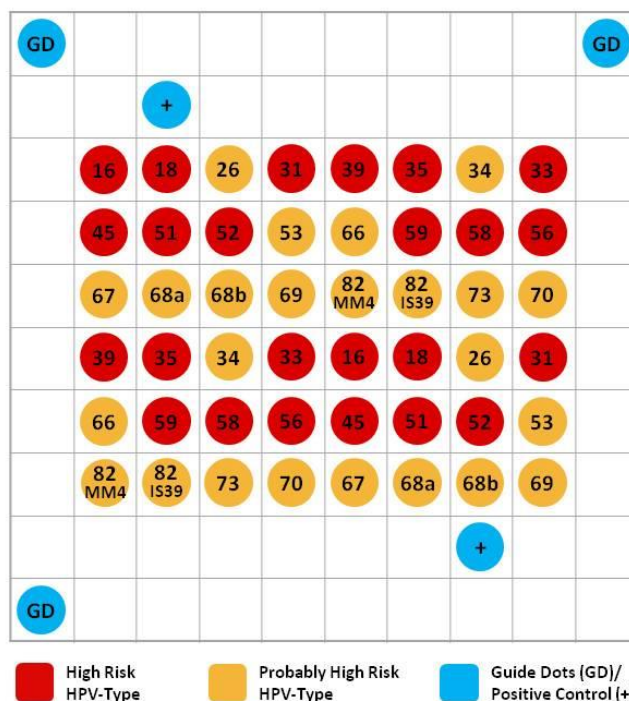
### 4. Enthaltene Komponenten

Die folgenden Komponenten sind enthalten:

Code	Komponente	Menge	
		10	50
VA-0002	VisionArray HPV High Risk Chip 1.0	10	5x10
	Gebrauchsanweisung	1	1

#### Beschreibung des Chips:

Positionierung der Fängersequenzen auf dem Chip:



### 5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) oder VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)
- VisionArray HPV PreCise Master Mix (ES-0007)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

Für einen erfolgreichen Scan müssen die VisionArray Analysis Packages den VisionArray HPV High Risk Chip File 1.0 (E-4202) enthalten.

### 6. Lagerung und Handhabung

Die Chips müssen in der unversehrten Originalverpackung bei -16...-22°C gelagert werden. Werden die Chips unter diesen Lagerbedingungen aufbewahrt, sind die Chips ohne Leistungsverlust mindestens bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum funktionsfähig.

Nach dem Öffnen der Originalverpackung bei -16...-22°C lagern und innerhalb von zwei Monaten verwenden.

## 7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Chips nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Chips sollten unter staubfreien Bedingungen verwendet werden. Kontaminationen der Chip-Oberfläche mit Staub oder anderen Partikeln vermeiden!
- Direkten Kontakt mit dem Array Feld auf der Chip-Oberfläche vermeiden!
- Nur die etikettierte Seite des Objektträgers kann für die Hybridisierung verwendet werden.
- Kreuzkontamination der Proben vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.

## 8. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.
- Der Chip ist nur für den Nachweis der HPV-Typen, die in 2. „Klinische Relevanz“ beschrieben werden, zu verwenden.

Außerdem können folgende Faktoren das Nachweissystem beeinflussen:

- Abweichungen von dem empfohlenen Detektionsprotokoll (z.B. Temperatur oder Volumina der Reagenzien).
- Degradiertes oder gering konzentriertes DNA-Material.
- Ungeeignetes Ausgangsmaterial.
- Verwendung von nicht kalibrierter oder beschädigter Ausstattung.
- Bei starken HPV-Infektionen oder im Fall von multiplen Infektionen kann die Intensität der PCR-Positivkontrolle beeinträchtigt sein.
- Während der Durchführung nicht unter einer Laminar-Flow Werkbank arbeiten, da dies zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse führen kann.

## 9. Störsubstanzen

- Geringe PCR-Effizienz durch Inhibitoren aus dem DNA-Ausgangsmaterial (z.B. Blut).
- Verwendung von PCR-Additiven, welche die Hybridisierung beeinflussen können (z.B. DMSO, Betain, Urea).

## 10. Vorbereitung der Proben

Ausgangsmaterial für dieses Nachweissystem sind DNA-Sequenzen, die mit dem VisionArray HPV PreCise Master Mix amplifiziert und biotinyliert wurden.

Die Hybridisierung und Detektion der Chips muss mit dem VisionArray Detection Kit gemäß der Gebrauchsanweisung durchgeführt werden.

## 11. Vorbereitung der Reagenzien

Vor Verwendung die Chips auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen.

## 12. Durchführung

Den Scan wie in der Gebrauchsanweisung des entsprechenden VisionArray Analysis Package beschrieben durchführen.

## 13. Interpretation der Ergebnisse

Mit Hilfe des VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 ist es möglich, eine qualitative Aussage über das Vorhandensein oder die Abwesenheit von einem oder mehreren der 24 HPV-Typen in der untersuchten Probe zu treffen.

Die Intensität des Signals wird durch die Häufigkeit der Zielsequenz in der Probe sowie durch weitere Faktoren des Nachweissystems beeinflusst. Es ist nicht möglich, die absoluten Werte der Signalintensität zur Bestimmung der DNA-Konzentration zu verwenden.

## Software-basierte Auswertung

Die automatisierte Auswertung der Ergebnisse wird mit der entsprechenden VisionArray Analyzer Software durchgeführt. Eine umfangreiche Gebrauchsanweisung zur Chip-Analyse liegt der Software bei.

## 14. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

### Interne Kontrollen:

- Guide Dots/Hybridisierungskontrolle (GD): Diese Dots werden von der entsprechenden VisionArray Analyzer Software zur Positionierung des Grids verwendet. Zusätzlich ist die Färbung Beweis für eine erfolgreiche Durchführung der Hybridisierungs-, Markierungs- und Färbereaktion und wird zur Berechnung der relativen Signalintensitäten verwendet.
- Positivkontrolle/PCR-Kontrolle (+): Diese Kontrollen werden zur Bewertung der PCR-Reaktion und der Qualität des PCR-Templates verwendet.
- Alle Fängersequenzen und die Positivkontrolle sind als Duplikate und die Guide Dots sind als Triplikate auf dem Chip aufgebracht. Die Signale sind als runde Hybridisierungssignale auf dem Chip sichtbar.

### Externe Kontrollen:

Um die korrekte Leistung der verarbeiteten Proben und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von extern validierten positiven und negativen Kontrollproben begleitet werden. Wenn interne und/oder externe Kontrollen keine angemessene Färbung nachweisen können, sind die Ergebnisse mit Patientenproben als ungünstig anzusehen.

## 15. Leistungsmerkmale

### 15.1 Analytische Leistung:

Die analytische Spezifität und Sensitivität des VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 wurde für jeden der 24 HPV-Fängersequenzen einzeln, zusammen mit 17 Low Risk HPV-Typen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden sequenzgeprüfte Plasmide mit einer Konzentration von 50-500.000 Genomäquivalenten (GEQ) getestet. In einem weiteren Experiment wurden WHO-zugelassene Standards zur Bewertung von HPV 16 und HPV 18 verwendet. Die Ergebnisse der Tests mit Plasmidverdünnungen und der Tests mit den WHO-zugelassenen Standards waren konsistent.

### Spezifität und Detektionslimit für alle 24 HPV-Typen

HPV-Typ	Spezifität [%]	Detektionslimit (GEQ)
16 (HR)	100	50
18 (HR)	100	50
26	100	500
31 (HR)	100	500
33 (HR)	100	50
34	100	50
35 (HR)	100	50
39 (HR)	100	50
45 (HR)	100	50
51 (HR)	100	50
52 (HR)	100	500
53	100	500
56 (HR)	100	50
58 (HR)	100	500
59 (HR)	100	5.000
66	100	500
67	100	50
68a	100	5.000
68b	97,6	500
69	100	500
70	100	50
73	100	5.000
82IS39	100	50
82MM4	100	500

Die Sensitivität des Nachweissystems wurde für jeden HPV-Typ einzeln getestet. Die Sensitivität ist abhängig von der Anzahl und der Effizienz der PCR-Zyklen sowie von der Affinität der Fänger.

Die ermittelte Sensitivität bezieht sich auf den Nachweis einer einzelnen Zielsequenz. Der Nachweis von multiplen Infektionen kann zur Beeinträchtigung der Sensitivität einiger HPV-Typen führen, da es insbesondere in gemischten Proben mit starkem Konzentrationsunterschied zur Konkurrenz während der PCR-Reaktion kommen kann.

Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden.

### 15.2 Kreuzhybridisierungen:

- HPV 68a hybridisiert in 50% aller Fälle bei HPV 68b, wenn in hohen Konzentrationen vorliegend. Bei geringeren Konzentrationen ist jedoch keine Kreuzhybridisierung zu beobachten. HPV 68b ist allerdings ein Subtyp und daher in hohen Konzentrationen nicht von HPV 68a zu unterscheiden.

### 15.3 Cutoff

Zur Auswertung der Ergebnisse ist die Dot-Größe auf 50 gesetzt.

Der Schwellenwert (Cutoff) wurde für das Graustufenbild dieser Dot-Größe auf 25 gesetzt. Ein Signal unterhalb dieses Wertes wird von der entsprechenden VisionArray Analyzer Software als Hintergrund betrachtet.

### 16. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

### 17. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu einer Beeinträchtigung des Nachweises der Zielsequenz führen.

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Kein Signal	Falsche Temperatur	Hybridisierungstemperatur prüfen
	Abgelaufene Reagenzien	Reagenzien prüfen
Nur Guide Dots und keine weiteren Signale	Probleme mit dem PCR-Produkt (PCR ist nicht effizient genug oder die Template-DNA ist degradiert)	Mit einer Positivkontrolle die PCR-Effizienz überprüfen; PCR-Chemikalien und Thermocycler-Programm prüfen; PCR-Produkt im Agarosegel prüfen
	Falsches Ausgangsmaterial	Ausgangsmaterial prüfen
	Falsche Kombination von Chip und Probe	Kombination aus Probe/Chip prüfen
Nur Guide Dots und PCR-Kontrolle, aber keine weiteren Signale	Keine Zielsequenz vorhanden	Positivkontrolle verwenden
Nur Guide Dots und spezifische Signale, aber keine positive Kontrolle	Starke HPV-Infektion oder multiple HPV-Infektionen	DNA-Proben verdünnen
	Degradierte Probe	Neue DNA-Extraktion; bei -16...-22°C lagern
Zu viel Hintergrundsignal	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu lang; Temperatur während der Inkubation zu hoch	Inkubationszeit und -temperatur mit Detection Solution und Blue Spot Solution prüfen
	Objektträger nicht ausreichend getrocknet	Trocknungsschritt prüfen
Starke, auslaufende Signale	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu lang; Temperatur während der Inkubation zu hoch	Schrittweise Anpassung der Inkubationsdauer und -temperatur mit Detection Solution und Blue Spot Solution
Schwache Signale	Hybridisierungstemperatur inkorrekt	Temperatur prüfen
	Hybridisierungszeit zu kurz	Hybridisierungszeit bis maximal 30 min verlängern
	Inkubation mit Detection Solution oder Blue Spot Solution zu kurz	Inkubationszeit mit Detection Solution und Blue Spot Solution verlängern

	Schwache PCR-Amplifikation/ schlechte Qualität der Template-DNA	Template-DNA prüfen
Kreuzhybridisierungssignale, falsch positive Signale	Kontamination der PCR-Chemikalien oder des PCR-Produkts	Verwendete PCR-Chemikalien ersetzen
	Kontamination während der Vorbereitung der PCR oder des Hybridisierungsmix	Transfer der Probe während der Vorbereitung des Mix vermeiden
	Hybridisierungstemperatur zu gering	Hybridisierungstemperatur prüfen
	Mehrere Chips zu lange im gleichen Wash Buffer inkubiert	Schnelle Durchführung der Waschschritte
Einzelne Signale statt Duplikate	Mechanische Eliminierung des zweiten Signals, z.B. durch Kontakt mit der Pipettenspitze	Direkten Kontakt mit dem Array Feld vermeiden
	Unregelmäßige Abdeckung des Array Feldes aufgrund von Luftblasen	Lösungen ohne Luftblasen auftragen
	Schwache Signale um den Schwellenwert (1 drüber und 1 drunter)	PCR und Detektion unter Berücksichtigung der in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Bedingungen wiederholen

### 18. Literatur

- 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.
- Schmitt M, et al. (2008) Journal of Clinical Microbiology 46:1050-1059.
- Schmitt M, et al. (2013) International Journal of Cancer 132:2395-2403.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung. Bitte kontaktieren Sie [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



42 life sciences GmbH & Co. KG  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Deutschland  
Telefon: +49 471 4832-500  
Fax: +49 471 4832-308  
www.42ls.com  
Email: info@42ls.com

**Vertrieb durch:**  
ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572  
Bremerhaven/Deutschland  
Telefon: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
www.zytovision.com  
Email: info@zytovision.com

**Warenzeichen:**  
VisionArray® ist ein Warenzeichen der  
42 life sciences GmbH & Co. KG