



## VisionArray HPV PreCise Master Mix

**REF** ES-0007-50  50 ensayos

Para la amplificación de las secuencias específicas del  
VPH



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*  
conforme a la Directiva europea 98/79/CE

### 1. Uso previsto

VisionArray HPV PreCise Master Mix está previsto para amplificar y biotinilar secciones específicas de la región L1 de los genomas del virus del papiloma humano (VPH) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

VisionArray HPV PreCise Master Mix está diseñado para amplificar los tipos de VPH, incluidos, entre otros, los detectados por los chips VisionArray HPV Chips correspondientes y las secuencias genómicas del gen HLA-DQA1 humano como control positivo de PCR.

VisionArray HPV PreCise Master Mix debe utilizarse con el kit VisionArray Detection Kit y los chips VisionArray HPV Chips correspondientes. El análisis automatizado debe realizarse con un paquete de análisis VisionArray Analysis Package.

Este producto está diseñado para uso diagnóstico *in vitro* (conforme a la Directiva europea 98/79/CE). Los resultados deben ser interpretados por un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y junto con otros datos clínicos y anatomopatológicos.

### 2. Relevancia clínica

Consultar las instrucciones de uso del chip correspondiente.

### 3. Principio del ensayo

Las secuencias de ADN pueden amplificarse de forma selectiva mediante la PCR. El principio básico de la PCR se basa en un círculo recurrente de 3 pasos: desnaturalización, hibridación y elongación. La repetición de estos pasos da lugar a una amplificación exponencial de las secuencias objetivo.

El primer paso de cada ciclo es la desnaturalización, en la que el calentamiento de la mezcla de reacción produce cadenas simples de ADN. Durante la hibridación, los cebadores complementarios se unen al ADN monocatenario.

Los cebadores flanquean la secuencia objetivo y sirven como punto de partida para la integración de nucleótidos durante la fase de elongación, creando copias idénticas de la plantilla de ADN. Los cebadores utilizados en este kit están marcados con una molécula de biotina. Por lo tanto, cada nuevo producto de PCR es biotinilado de forma automática, lo que posteriormente permite la detección de anticuerpos.

VisionArray HPV PreCise Master Mix es una mejora del sistema GP5/GP6 (Snijders et al., 1990) y está dirigido contra el gen L1, una región bien conservada del genoma del VPH. En función del genotipo del VPH, la amplificación genera productos de PCR de longitud de fragmento de 139-148 pb.

La OMS recomienda cebadores contra el gen HLA-DQA1 humano como control positivo en sus manuales de laboratorio del virus del papiloma humano, por lo que también se incluyen en VisionArray HPV PreCise Master Mix.

Para evitar la contaminación con productos de amplificación por PCR, se incluyen nucleótidos de uracilo en VisionArray HPV PreCise Master Mix. Mediante la realización de un paso de uracilo-ADN-glicosilasa antes de la PCR, se pueden eliminar todas las secuencias que contienen bases de uracilo y, por lo tanto, posibles contaminaciones con productos de PCR anteriores de VisionArray. La uracilo-ADN-glicosilasa se inactiva a temperaturas superiores a 95 °C, de modo que la reacción de PCR se puede realizar con normalidad.

### 4. Reactivos suministrados

VisionArray HPV PreCise Master Mix se compone de:

- VisionArray HPV Primer
- PreCise Taq DNA Polymerase
- Uracil-DNA Glycosylase
- H<sub>2</sub>O
- MgCl<sub>2</sub>
- Tampón PCR
- Solución dNTP/dUTP

VisionArray HPV PreCise Master Mix se comercializa en un tamaño:

- ES-0007-50: 0,75 ml (50 reacciones de 15 µl cada una)

### 5. Material necesario no suministrado

**Reactivos:**

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

**Equipo:**

- Recipientes de PCR
- Termociclador
- Pipetas
- VisionArray HPV Chips (VA-0001; VA-0002)
- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) o VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)

*Nota: los paquetes de análisis VisionArray deben incluir un archivo de chip VisionArray HPV Chip File para lograr un escaneo satisfactorio.*

### 6. Almacenamiento y manipulación

VisionArray HPV PreCise Master Mix debe almacenarse entre -16 y -22°C en posición vertical. Si se cumplen estas condiciones de almacenamiento, el producto funcionará, sin pérdida de rendimiento, al menos hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Reducir el número de ciclos de congelación-descongelación a un máximo de 10 ciclos mediante el almacenamiento en alícuotas de trabajo. Una vez abierto el vial, utilizar el producto en los 6 meses siguientes.

El período de tiempo a temperatura ambiente del producto de PCR debe ser lo más breve posible.

### 7. Advertencias y precauciones

- Leer las instrucciones del producto antes del uso.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Evitar la contaminación cruzada y bacteriana de los reactivos.
- Nunca pipetear soluciones con la boca.

- La ficha de datos de seguridad para el usuario profesional está disponible previa solicitud.
- Para evitar contaminaciones es necesaria una separación de salas de los pasos de trabajo con y sin ADN, así como el uso de bancos limpios para la preparación de la mezcla maestra de PCR.

## 8. Limitaciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Solo para uso profesional.
- Los resultados deben ser interpretados por un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y junto con otros datos clínicos y anatomopatológicos.
- Es importante utilizar las cantidades indicadas de los componentes para evitar alteraciones en el proceso de reacción.
- La congelación y descongelación repetidas de las muestras de ADN pueden alterar la reacción de detección.

## 9. Sustancias interferentes

- Baja eficiencia de la PCR debido a la inhibición de la PCR en materia prima de ADN (por ejemplo, sangre).
- Las altas concentraciones de EDTA en tampones de elución pueden producir una inhibición de la PCR. Utilizar únicamente las cantidades de ADN recomendadas.

## 10. Preparación de muestras

Se pueden utilizar muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE), muestras de hisopado o raspado del cuello uterino y muestras ThinPrep como material de partida para el genotipado del VPH.

### Kits de extracción de ADN recomendados:

- Muestras FFPE: VisionArray FFPE DNA Extraction Kit (VI-0001).
- Muestras ThinPrep: VisionArray Cytology DNA Extraction Kit (VI-0002).

Después de la extracción, es preciso determinar la concentración de ADN para verificar la calidad y cantidad del ADN. Cada muestra debe tener una concentración de ADN de al menos 15 ng/ $\mu$ l con un alto grado de pureza (260/280: ~1,8).

Evitar contaminar el ADN durante el procedimiento de extracción. Si se utiliza un micrótopo, las secciones de tejido deben colocarse inmediatamente en un tubo de reacción tras el corte. La cuchilla del micrótopo debe cambiarse entre diferentes muestras de tejido. Esto también es aplicable a las muestras de tejido ya fijadas montadas en portaobjetos de vidrio. El raspador debe cambiarse entre diferentes muestras.

## 11. Preparación previa del producto

Como primer paso, determinar la cantidad de PCR necesarias (n), que se obtiene de la cantidad de muestras de ADN más un control negativo (mezcla de reacción sin plantilla de ADN).

### Esquema de pipeteado:

N.º	Reactivos	1x (conc. final)	nx
1	<u>VisionArray HPV PreCise Master Mix</u>	15 $\mu$ l (1 vez)	
2	Muestra de ADN	2,5-5 $\mu$ l	
3	H <sub>2</sub> O	hasta 25 $\mu$ l	
	<b>Volumen total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	

- Distribuir en alícuotas VisionArray HPV PreCise Master Mix en viales de PCR sin ADN/ADNasa.
- Pipetear la muestra de ADN en la mezcla maestra (n.º 2 en el esquema de pipeteado). Para el control negativo, añadir 10  $\mu$ l de agua sin ADN/ADNasa.
- Si es necesario, añadir agua para alcanzar el volumen de reacción final de 25  $\mu$ l (n.º 3 en el esquema de pipeteado).
- Transferir las muestras a un termociclador precalentado y calibrado.

## 12. Procedimiento de ensayo

El protocolo de amplificación descrito en este manual se ha establecido en viales de PCR de 0,2 ml utilizando las enzimas recomendadas en un sistema termociclador Biometra TProfessional. Si se utilizan otros termocicladores, se pueden realizar modificaciones según las indicaciones del fabricante, en caso necesario. Por lo tanto, debe verificarse la compatibilidad de este protocolo antes de su uso. El termociclador utilizado debe calibrarse de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

### Perfil térmico:

Tiempo	Temperatura	Repeticiones	Paso
10 min	25 °C	x1	Incubación de uracilo-ADN-glicosilasa
10 min	95 °C	x1	Activación de la polimerasa HotStart <i>Taq</i> , Desactivación de la uracilo-ADN-glicosilasa
20 s	95 °C	x10	Desnaturalización
30 s	55 °C		Hibridación
80 s	60 °C		Elongación
20 s	95 °C	x35	Desnaturalización
30 s	38 °C		Hibridación
80 s	60 °C		Elongación
1 min	95 °C	x1	Desnaturalización
$\infty$	8 °C	x1	

Tiempo de rampa:  $\Delta$  5 °C/s

El perfil térmico está optimizado para los reactivos recomendados en este manual. El usuario debe validar los cambios en la composición o la configuración química antes de su uso.

Una vez finalizada la PCR, el vial de reacción debe almacenarse entre -16°C y -22°C.

## 13. Interpretación de los resultados

VisionArray HPV PreCise Master Mix está previsto para utilizarse con un chip VisionArray HPV Chip y un kit VisionArray HPV Detection Kit. La interpretación de los resultados debe hacerse con la ayuda del paquete de análisis VisionArray Analysis Package correspondiente.

## 14. Procedimientos de control de calidad recomendados

Para controlar el correcto rendimiento de las muestras procesadas y los reactivos analíticos, cada ensayo debe ir acompañado de muestras de control externas, positivas y negativas, validadas. Si los controles internos o externos no revelan una función adecuada, los resultados de las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

El control de la PCR y los amplificadores se puede realizar posteriormente mediante separación en una electroforesis en gel de agarosa. La longitud del fragmento de los tipos de VPH es de aproximadamente 140 pb y solo se observa en una muestra positiva de VPH. El control positivo muestra una banda a 227 pb.

Debido a la baja temperatura de hibridación y las condiciones de la PCR que favorecen los productos monocatenarios, no se observan bandas claramente delimitadas en los ensayos. Sin embargo, se puede lograr una hibridación de chips satisfactoria. Solo la ausencia completa de una banda en el gel indica una PCR errónea. Consultar el apartado Resolución de problemas para obtener más información.

## 15. Características de rendimiento

Consultar las características de rendimiento del chip VisionArray HPV Chip correspondiente.

## 16. Eliminación

La eliminación de los reactivos debe llevarse a cabo de acuerdo con las normativas locales.

## 17. Resolución de problemas

Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede alterar la reacción de detección de la secuencia objetivo.

Problema	Posible causa	Medida
Ausencia de producto de amplificación o muy pequeño	Reactivos de PCR caducados o en mal estado; programa del termociclador incorrecto.	Verificar los reactivos de PCR y el programa del termociclador.
	Plantilla de ADN dañada; bajo rendimiento del ADN.	Almacenar el ADN entre -16 y -20 °C; evitar la congelación y descongelación repetidas; utilizar otro protocolo de extracción.
	Inhibidores de la PCR en la mezcla de reacción.	Utilizar otro protocolo de extracción.
Amplificados de PCR en el control negativo	Contaminación de los reactivos durante la preparación de la muestra o en la configuración de la PCR.	Utilizar reactivos frescos; evitar la contaminación de la muestra.

## 18. Bibliografía

- 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.

Nuestros expertos están a su disposición para resolver cualquier duda. Póngase en contacto con [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



42 life sciences GmbH & Co. KG  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Alemania  
Teléfono: +49 471 4832-500  
Fax: +49 471 4832-308  
[www.42ls.com](http://www.42ls.com)  
Correo electrónico:  
[info@42ls.com](mailto:info@42ls.com)

### Distribuido por:

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

### Marcas comerciales:

VisionArray® es una marca comercial de  
42 life sciences GmbH & Co. KG