



VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0

REF ES-0008-50 50 ensayos

Para la amplificación de secuencias específicas de micobacterias



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

1. Uso previsto

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 está diseñado para amplificar y biotinilar secciones específicas del ITS y, en el caso del complejo M. tuberculosis, la región IS6110 y, en el caso de M. chimaera, la región SR4 (Zozaya-Valdés et al 2017) de genomas micobacterianos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando muestras de ADN extraídas, por ejemplo, de muestras clínicas, frotis pulmonares o muestras cultivadas.

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 está diseñado para amplificar los tipos de VPH, incluidos, entre otros, los detectados por los chips VisionArray MYCO Chips correspondientes y las secuencias genómicas del gen HLA-DQA1 humano como control positivo de PCR.

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 h debe utilizarse con el kit VisionArray Detection Kit y los chips VisionArray MYCO Chips correspondientes. El análisis automatizado debe realizarse con VisionArray Software.

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, hidridación 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..

Para evitar la contaminación con productos de amplificación por PCR, se incluyen nucleótidos de uracilo en VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0. 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

The VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 se compone de:

- VisionArray MYCO Primer
- Taq DNA Polymerase
- Uracil-DNA Glycosylase
- H₂O
- MgCl₂
- PCR-Buffer
- dNTP/dUTP Solution

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 se comercializa en un tamaño:

- ES-0008-50: 0,75 ml (50 reacciones de 15 µl cada una)

5. Material necesario no suministrado

Reactivos:

- H₂O (grado PCR)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

Equipo:

- Recipientes de PCR
- Termociclador
- Pipetas
- VisionArray MYCO Chip 2.0 (VA-0005)
- VisionArray SingleScan Software (E-4301) o VisionArray MultiScan Software (E-4302)

6. Almacenamiento y manipulación

VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 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.
- Compruebe que el envase esté intacto antes de usar el producto. No lo utilice si el envase está dañado.
- 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

- Low PCR efficiency due to PCR inhibition in DNA raw material (e.g. blood).
- High concentrations of EDTA in DNA elution buffers may lead to an inhibition of the PCR. Use only the recommended amounts of DNA.

10. Preparación de muestras

Las muestras de ADN extraídas, por ejemplo, de muestras clínicas, frotis pulmonares o muestras cultivadas pueden utilizarse como material de partida para el genotipado de micobacterias.

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/ μ 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 MYCO PreCise Master Mix 2.0</u>	15 μ l	
2	Sample DNA	2.5-5 μ l	
3	H ₂ O	ad 25 μ l	
	Volumen total	25 μl	

- Distribuir en alícuotas VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 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 μ l de agua sin ADN/ADNasa.
- Si es necesario, añadir agua para alcanzar el volumen de reacción final de 25 μ 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	x35	Desnaturalización
90 s	60°C		Elongación
60 s	95°C	x1	Desnaturalización
∞	10°C	x1	

Tiempo de rampa: Δ 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

The VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 está previsto para utilizarse con un VisionArray MYCO Chip y un kit VisionArray Detection Kit. Interpretación de los resultados debe hacerse con la ayuda del VisionArray Software 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 tinción 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 MYCO Chip.

16. Eliminación

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

