



VisionArray HPV Chip 1.0

REF	VA-0001-10	Σ	10 ensayos
REF	VA-0001-50	Σ	50 ensayos

Para la detección específica de 41 tipos de virus del papiloma humano (VPH) que se han producido con la ayuda del VisionArray HPV PreCise Master Mix.



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

1. Uso previsto

El chip VisionArray HPV Chip 1.0 está previsto para utilizarse con un paquete VisionArray Analysis Package para la detección cualitativa y el genotipado de amplificadores de PCR de 41 genotipos del virus del papiloma humano (VPH) clínicamente relevantes que se han producido con la ayuda del VisionArray HPV PreCise Master Mix.

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

Las infecciones por el VPH son frecuentes y representan un factor de riesgo importante para el desarrollo de un carcinoma de cuello uterino, por ejemplo. En la actualidad, se han descrito más de 150 tipos diferentes de VPH. En función del riesgo que presentan de producir cáncer, se dividen en tres tipos: bajo riesgo (BR), probablemente alto riesgo y alto riesgo (AR).

El chip VisionArray HPV Chip 1.0 está diseñado para detectar los 41 genotipos siguientes:

Clasificación de los 41 genotipos del VPH en el chip VisionArray HPV Chip 1.0

Alto riesgo	Probablemente alto riesgo	Bajo riesgo
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	26, 34, 53, 66, 67, 68a, 68b, 69, 70, 73, 82IS39, 82MM4	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 72, 81CP8304, 83MM7, 84MM8, 90, 91

Los tipos de VPH se clasificaron de acuerdo con la literatura científica actual.

3. Principio del ensayo

Se detectan fragmentos de ADN con una secuencia específica a partir de un conjunto de fragmentos de ADN en un chip de vidrio con la ayuda de secuencias de captura de ADN inmovilizadas mediante hibridación de ADN/ADN. Para este sistema de detección, como materia prima se pueden usar muestras de ADN de muestras de células o tejido fijadas en formol e incluidas en parafina. Como primer paso, se deben amplificar y biotilar las secuencias objetivo de estas muestras mediante PCR. Posteriormente, se realiza la hibridación entre las secuencias amplificadas y las capturas de ADN complementarias. Después de la hibridación, el ADN unido de forma inespecífica se elimina mediante etapas de lavado cortas y rigurosas. Luego, las secuencias biotiladas unidas específicamente se marcan de forma secundaria con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa y se visualizan mediante una tinción con tetrametilbencidina (TMB).

4. Reactivos suministrados

Se incluyen los siguientes componentes:

Código	Componentes	Cantidad	
		10 Σ	50 Σ
VA-0001	VisionArray HPV Chip 1.0	10	5 x 10
	Instrucciones de uso	1	1

Descripción del chip:

Posicionamiento de las secuencias de captura en el chip:

GD		+	6	11	16	18	26		GD
		31	33	34	35	39	40		
42	43	44	45	51	52	53	54	55	56
57	58	59	61	62	66	67	68a	68b	69
70	72	73	81	82 IS39	82 MM4	83	84	90	91
35	34	33	31	26	18	16	11	6	+
54	53	52	51	45	44	43	42	40	39
68a	67	66	62	61	59	58	57	56	55
		81	73	72	70	69	68b		
GD		91	90	84	83	82 MM4	82 IS39		

■ High Risk HPV-Type
 ■ Probably High Risk HPV-Type
 ■ Low Risk HPV-Type
 ■ Guide Dots (GD)/Positive Control (+)

*El VPH 55 ahora se clasifica como un subtipo de VPH 44, pero se sigue marcando como VPH 55 por motivos de coherencia.

5. Material necesario no suministrado

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

Los VisionArray Analysis Packages deben incluir el archivo de chip VisionArray HPV Chip File 1.0 (E-4201) para lograr un escaneo satisfactorio.

6. Almacenamiento y manipulación

Los chips deben almacenarse entre -16 y -22 °C en su embalaje original intacto. Si se cumplen estas condiciones de almacenamiento, los chips serán estables, sin pérdida de rendimiento, al menos hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Una vez abierto el embalaje original, almacenar los chips entre -16 y -22 °C y utilizarse en los dos meses siguientes.

7. Advertencias y precauciones

- Leer las instrucciones del producto antes del uso.
- No utilizar los chips después de la fecha de caducidad.
- Utilizar los chips en un entorno sin polvo. Evitar la contaminación de la superficie del chip con polvo u otras partículas.
- Evitar el contacto directo con el campo de matriz de la superficie del chip.
- Solo puede utilizarse el lado con etiqueta del portaobjetos para la hibridación.
- Evitar la contaminación cruzada de las muestras, ya que esto puede generar resultados erróneos.

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.
- El chip solo debe utilizarse para detectar los tipos de VPH indicados en el punto 2. "Relevancia clínica".

Además, los siguientes factores pueden afectar al sistema de detección:

- Desviación del protocolo de detección propuesto (por ejemplo, temperatura o volúmenes de los reactivos).
- Material de ADN dañado o de baja concentración.
- Materia prima inadecuada.
- Uso de equipos no calibrados o deteriorados.
- En infecciones fuertes por VPH o en caso de infecciones múltiples, la intensidad del control positivo de la PCR podría verse alterada.
- No trabajar bajo una cabina de flujo laminar durante el procedimiento de ensayo, ya que esto podría alterar los resultados.

9. Sustancias interferentes

- Baja eficiencia de la PCR debido a inhibidores de la PCR en la materia prima de ADN (por ejemplo, sangre).
- Uso de aditivos para PCR que podrían influir en la hibridación (por ejemplo, DMSO, betaína, urea).

10. Preparación de muestras

El material de partida de este sistema de detección son los productos de amplificación de PCR que se han producido con VisionArray HPV PreCise Master Mix.

La hibridación y detección de los chips deben realizarse con el kit VisionArray Detection Kit de acuerdo con las instrucciones de uso.

11. Preparación previa del producto

Llevar a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de su uso.

12. Procedimiento de ensayo

Realizar el escaneo de acuerdo con las instrucciones de uso del paquete de análisis VisionArray Analysis Package correspondiente.

13. Interpretación de los resultados

Con la ayuda del VisionArray HPV Chip 1.0, es posible hacer una declaración cualitativa sobre la presencia o ausencia de uno o más de los 41 tipos de VPH en la muestra analizada.

La intensidad de las señales se ve afectada por la prevalencia de las secuencias objetivo en la muestra, así como por otros factores del sistema de detección. No se pueden utilizar los valores absolutos de la intensidad de la señal para la cuantificación de la concentración de ADN.

Evaluación basada en software

La evaluación automatizada de los resultados se realiza mediante el software VisionArray Analyzer Software correspondiente. El software incluye un manual completo para el análisis de chips.

14. Procedimientos de control de calidad recomendados

Controles internos:

- Puntos guía (PG)/Control de hibridación: el software VisionArray Analyzer Software correspondiente utiliza estos puntos para el posicionamiento de la rejilla. Además, la tinción de los puntos guía es la prueba de una hibridación, etiquetado y reacción de tinción satisfactorios, y se utiliza para calcular la intensidad relativa de las señales.
- Control positivo (+)/Control de PCR: Estos controles se utilizan para evaluar la reacción PCR y la calidad de la plantilla de PCR.
- Todas las secuencias de captura y el control positivo se configuran en el chip como duplicados y los puntos de guía, como triplicados. Las señales se muestran en el chip como señales de hibridación circulares.

Controles externos:

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 alguno de los controles internos o externos no revelan una tinción adecuada, los resultados de las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

15. Características de rendimiento

15.1 Rendimiento analítico

Se analizó la especificidad y sensibilidad analíticas del chip VisionArray HPV Chip 1.0 para cada uno de los 41 tipos de VPH por separado. Para ello, se analizaron plásmidos verificados de secuencia con una concentración de 50-500 000 equivalentes de genoma (GEQ). En un experimento adicional, se utilizaron los estándares aprobados por la OMS para la evaluación del VPH 16 y el VPH 18. Los resultados de las pruebas con diluciones de plásmidos y las pruebas con los estándares aprobados por la OMS fueron coincidentes.

Especificidad y límite de detección de los 41 tipos de VPH

Tipo de VPH	Especificidad [%]	Límite de detección (EQG)
6	100	50
11	100	50
16 (AR)	100	50
18 (AR)	100	50
26	100	500
31 (AR)	100	500
33 (AR)	100	50
34	100	50
35 (AR)	100	50
39 (AR)	100	50
40	99,2	50
42	100	500
43	100	500
44	100	500
45 (AR)	100	50
51 (AR)	100	50
52 (AR)	100	500
53	100	500
54	100	50
55	100	5.000
56 (AR)	100	50
57	100	500
58 (AR)	100	500
59 (AR)	100	5.000
61	100	500
62	100	500
66	100	500

67	100	50
68a	100	5.000
68b	97,6	500
69	100	500
70	100	50
72	100	5.000
73	100	5.000
81CP8304	98,4	50
82IS39	100	50
82MM4	100	500
83MM7	100	500
84MM8	100	5.000
90	100	500
91	100	500

La sensibilidad depende de la cantidad y la eficiencia de los ciclos de PCR y la afinidad de los capturadores.

La sensibilidad determinada hace referencia a la detección de una secuencia objetivo única. La detección de una infección múltiple puede producir una alteración de la sensibilidad de algunos tipos de VPH, debido a la competencia durante la reacción PCR, sobre todo en muestras mixtas con una importante diferencia en la concentración.

El rendimiento se validó utilizando los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso. Cualquier modificación de estos procedimientos podría variar el rendimiento, por lo que debe validarla el usuario.

15.2 Hibridaciones cruzadas

- Cuando estuvo presente en concentraciones altas, el VPH 70 hibridó a VPH 40 en el 33 % de los casos. Sin embargo, en concentraciones más bajas no se observó hibridación cruzada.
- Cuando estuvo presente en concentraciones altas, el VPH 62 hibridó a VPH 81 en el 66 % de los casos. Sin embargo, en concentraciones más bajas no se observó hibridación cruzada.
- Cuando estuvo presente en concentraciones altas, el VPH 68a hibridó a VPH 68b en el 50 % de los casos. En concentraciones más bajas no se pudo observar hibridación cruzada. Sin embargo, el VPH 68b es un subtipo y, por lo tanto, en concentraciones altas no se distingue del VPH 68a.

15.3 Valor de corte

Para la evaluación de los resultados, el tamaño de punto se establece en 50.

El umbral (valor de corte) se estableció en 25 para la imagen en escala de grises de este tamaño de punto. Una señal por debajo de este valor se considerará ruido de fondo por el software VisionArray Analyzer Software 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
Sin señal	Temperatura incorrecta	Comprobar la temperatura de hibridación
	Reactivos caducados	Comprobar los reactivos
Solo aparecen los puntos guía, ninguna otra señal	Problemas con el producto de PCR (la PCR no es lo suficientemente eficiente o la plantilla de ADN está dañada)	Comprobar la eficiencia de la PCR con un control positivo. Verificar los productos químicos de la PCR y el programa del termociclador. Comprobar el producto de PCR en gel de agarosa
	Materia prima incorrecta	Comprobar las materias primas
	Combinación incorrecta de chip y muestra	Comprobar la combinación de chip y muestra

Solo aparecen los puntos guía y el control de la PCR, pero ninguna otra señal	No hay ninguna secuencia objetivo	Usar un control positivo
Solo aparecen los puntos guía y señales de VPH, pero no el control positivo	Infección fuerte por VPH o infección múltiple por VPH	Diluir la muestra de ADN
	Muestra dañada	Nueva extracción de ADN. Almacenar entre -16 y -22 °C
Demasiado ruido de fondo	Tiempo de incubación de la Solución de detección o la Solución Blue Spot demasiado largo. Temperatura durante la incubación demasiado alta	Comprobar el tiempo y la temperatura de incubación de la Solución de detección y la Solución Blue Spot
	Los portaobjetos no están bien secos	Comprobar la etapa de secado
Señales fuertes y con fuga	Tiempo de incubación de la Solución de detección o la Solución Blue Spot demasiado largo o temperatura demasiado alta	Ajuste gradual del tiempo y la temperatura de incubación de la Solución de detección y la Solución Blue Spot
Señales débiles	Temperatura de hibridación incorrecta	Comprobar temperatura
	Tiempo de hibridación demasiado corto	Aumentar el tiempo de hibridación hasta un máximo de 30 min
	Tiempo de incubación de la Solución de detección o la Solución Blue Spot demasiado corto	Aumentar el tiempo de incubación de la Solución de detección y la Solución Blue Spot
	Amplificación de PCR débil/mala calidad de la plantilla de ADN	Comprobar la plantilla de ADN
Problema	Posible causa	Medida
Señales de hibridación cruzada, señales falsas positivas	Contaminación de los productos químicos de PCR o el producto de PCR	Sustituir los productos químicos de PCR en uso
	Contaminación durante la preparación de la PCR o la mezcla de hibridación	Evitar la transferencia de la muestra durante la preparación de la mezcla
	Temperatura de hibridación demasiado baja	Comprobar la temperatura de hibridación
	Varios chips incubados demasiado tiempo en el mismo tampón de lavado	Ejecución rápida de los pasos de lavado
Señal única en lugar de duplicados	Eliminación mecánica de la segunda señal, p. ej., debido al contacto con la punta de la pipeta	Evitar el contacto directo con el campo de matriz
	Cobertura irregular del campo de matriz debido a burbujas de aire	Aplicar las soluciones evitando las burbujas de aire
	Señales débiles alrededor del umbral (1 arriba y 1 abajo)	Repetir la PCR y la detección teniendo en cuenta las condiciones requeridas en el manual

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

Nuestros expertos están a su disposición para resolver cualquier duda.
Póngase en contacto con 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
Correo electrónico:
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
Correo electrónico:
info@zytovision.com

Marcas comerciales:

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