



VisionArray Detection Kit

REF VK-0003-50 Σ 50 ensayos



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

1. Uso previsto

El kit VisionArray Detection Kit se ha desarrollado para utilizarse con VisionArray PreCise Master Mix y el correspondiente chip VisionArray DNA Chip para la detección cualitativa de secuencias de ADN específicas. 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

Los fragmentos de ADN específicos de secuencia en un conjunto de fragmentos de ADN se detectan mediante hibridación de ADN/ADN con captadores de ADN inmovilizados en un chip de vidrio. Primero, las secuencias objetivo de este material deben amplificarse mediante PCR y, al mismo tiempo, marcarse con moléculas de biotina. Posteriormente, las secuencias amplificadas se hibridan con los captadores de ADN complementarios en el chip de vidrio. Después de la hibridación, los fragmentos de ADN unidos de forma inespecífica se eliminan mediante pasos de lavado cortos y rigurosos. Las secuencias específicamente unidas y biotiniladas se visualizan mediante marcado secundario con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa y una tinción con tetrametilbencidina (TMB).

4. Reactivos suministrados

Se incluyen los siguientes componentes:

Código	Componentes	Cantidad	Envase
HY-0001-1	Hybridization Solution	1 ml	Recipiente de reacción, tapa roja
WB-0012-250	100x Wash Buffer	250 ml	Frasco con tapón de rosca (grande)
AB-0016-5	Detection Solution	5 ml	Frasco con tapón de rosca (pequeño)
SB-0009-5	Blue Spot Solution	5 ml	Frasco con tapón de rosca (pequeño), marrón
	Instrucciones de uso	1	

La Hybridization Solution, la Detection Solution y la Blue Spot Solution se suministran con una cantidad suficiente para 50 reacciones. El 100x Wash Buffer se suministra con una cantidad suficiente para 50 ensayos con 6 cubetas de tinción de 70 ml cada una.

5. Material necesario no suministrado

Reactivos:

- Producto de PCR creado con VisionArray PreCise Master Mix
- Agua desionizada o destilada

Equipo:

- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) o VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)
- VisionArray DNA Chips
- Hibridador u horno de hibridación con cámara húmeda
- Centrífuga para portaobjetos
- Cubetas de tinción, 50-80 ml
- Pipetas

Nota: los paquetes de análisis VisionArray deben incluir el archivo del chip VisionArray correspondiente para lograr un escaneo satisfactorio.

6. Almacenamiento y manipulación

Los componentes del kit deben almacenarse entre 2 y 8 °C en posición vertical. Almacenar la Blue Spot Solution protegida de la luz. Si se cumplen estas condiciones, el kit funcionará, sin pérdida de rendimiento, al menos hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

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.
- Algunos de los componentes del kit contienen sustancias (en concentraciones y volúmenes bajos) que son perjudiciales para la salud. Evitar el contacto directo con los reactivos. Tomar las medidas de protección adecuadas (utilizar guantes desechables, gafas de protección y ropa de laboratorio).
- Si los reactivos entran en contacto con la piel, lavar inmediatamente con agua abundante.
- Nunca pipetear soluciones con la boca.
- La ficha de datos de seguridad para el usuario profesional está disponible previa solicitud.

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.
- Los componentes del kit están muy ajustados entre sí, por lo que la sustitución de uno o más componentes puede producir errores de rendimiento.
- 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.
- 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 afectar a la hibridación (por ejemplo, DMSO, betaína, urea).

10. Preparación de muestras

El material de partida de este sistema de detección son secuencias de ADN que se han amplificado y biotinilado con VisionArray PreCise Master Mix.

11. Preparación previa del producto

- Preparación del 1x Wash Buffer: Diluir 1 parte del 100x Wash Buffer con 99 partes de agua desionizada o destilada (en un recipiente cerrado, el 1x Wash Buffer diluido es estable durante un mes a temperatura ambiente [entre 18 y 22 °C]).
- Dejar que la Hybridization Solution, la Detection Solution, la Blue Spot Solution y el 1x Wash Buffer alcancen la temperatura ambiente (entre 18 y 22 °C). Los posibles precipitados de la Hybridization Solution deben disolverse mediante un breve calentamiento (máx. 37 °C).
- Precalentar el hibridador o el horno de hibridación a 42 °C.

12. Procedimiento de ensayo

- 1 Retirar la cubierta protectora de los marcos azules del campo de matriz.
- 2 Preparación de la mezcla de hibridación:
 - 20 µl de Hybridization Solution
 - + 10 µl de producto de PCR
 - 30 µl de mezcla de hibridación (suficiente para un chip)

Mezclar bien la mezcla de hibridación pipeteando de abajo a arriba.
- 3 Pipetear cuidadosamente 30 µl de la mezcla de hibridación en el lado izquierdo del campo de matriz (con la etiqueta a la derecha), evitando que queden burbujas de aire. Cubrir con cuidado todo el campo de matriz con la lámina de plástico suministrada, de izquierda a derecha.
- 4 Transferir el chip rápidamente al hibridador u horno de hibridación con cámara húmeda precalentado e incubar durante 30 minutos a 42 °C (± 1 °C).

Nota: este paso debe realizarse individualmente para cada matriz, nunca en paralelo. Deben evitarse las desviaciones de más de 1 °C. Se recomienda utilizar un termómetro calibrado.

- 5 Mientras tanto, preparar 3 cubetas de tinción con 1x Wash Buffer.
- 6 Una vez finalizado el tiempo de incubación, sacar el chip de la incubadora y retirar la lámina de plástico con cuidado. Golpear suavemente para escurrir la mezcla de hibridación sobre un pañuelo de papel y lavar el portaobjetos de inmediato en el 1x Wash Buffer. Luego, agitar suavemente el portaobjetos 3 veces de derecha a izquierda en la primera cubeta de tinción. Repetir este procedimiento de lavado en la segunda cubeta de tinción. Seguidamente, transferir el chip a la tercera cubeta de tinción, agitar 3 veces e incubar durante 1 minuto.

Nota: no utilizar más de 6 portaobjetos por cubeta de tinción. Los portaobjetos no manipulados deben permanecer a temperatura de hibridación. La exposición a temperatura ambiente debe ser lo más corta posible.

- 7 Sacar el chip de la cubeta de tinción, escurrirlo brevemente en un pañuelo y secarlo por centrifugación en la centrífuga para portaobjetos durante 15-30 segundos.

Nota: el uso de una centrífuga para portaobjetos es absolutamente obligatorio para evitar que queden gotas en la matriz.

- 8 Pipetear con cuidado 100 µl de Detection Solution en el campo de matriz seco sin tocar la superficie. El campo de matriz debe quedar

cubierto de manera uniforme y deben eliminarse las burbujas de aire.

- 9 Incubar durante 10 minutos en una superficie uniforme a temperatura ambiente (entre 18 y 22 °C).
- 10 Mientras tanto, preparar 3 cubetas de tinción con 1x Wash Buffer.
- 11 Tras la incubación, lavar y secar tal como se ha descrito en los pasos 6 y 7. Conservar la última cubeta de tinción utilizada para el paso 13.
- 12 Aplicar con cuidado 100 µl de Blue Spot Solution sobre todo el campo de matriz e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (entre 18 y 22 °C). El desarrollo del color se puede observar mediante inspección visual. En el caso de una tinción rápida y fuerte, la incubación puede detenerse antes de tiempo.
- 13 Escurrir y lavar la Blue Spot Solution del chip en la cubeta de tinción con 1x Wash Buffer del paso 10 durante aproximadamente 15 segundos.
- 14 Golpear suavemente para escurrir el chip en un pañuelo de papel y secarlo por centrifugación en la centrífuga para portaobjetos durante 30 segundos.

Nota: la Blue Spot Solution debe almacenarse e incubarse en la oscuridad.

Los chips ahora están listos para el análisis con los paquetes de análisis VisionArray.

13. Interpretación de los resultados

13.1 Nota general

Con la ayuda del VisionArray DNA Chip, es posible hacer una declaración sobre la presencia o ausencia de secuencias de ADN específicas. La intensidad de las señales se ve afectada por la frecuencia 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 determinación de la concentración de ADN.

13.2 Evaluación

Después de seguir este protocolo, se puede proceder a la evaluación del chip. Las señales positivas se muestran como áreas circulares de color azul oscuro en el portaobjetos. La evaluación automatizada del chip se lleva a cabo con el software VisionArray Analyzer Software correspondiente.

13.3 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

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.

15. Características de rendimiento

Consultar las características de rendimiento del correspondiente VisionArray DNA Chip.

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 específicas, pero no el control positivo	Muestra dañada	Nueva extracción de ADN. Almacenar entre -16 y -22 °C
Demasiado ruido de fondo	Tiempo de incubación de la Detection Solution o la Blue Spot Solution demasiado largo. Temperatura durante la incubación demasiado alta	Comprobar el tiempo y la temperatura de incubación de la Detection Solution y la Blue Spot Solution
	Los portaobjetos no están bien secos	Comprobar la etapa de secado
Señales fuertes y con fuga	Tiempo de incubación de la Detection Solution o la Blue Spot Solution demasiado largo o temperatura demasiado alta	Ajuste gradual del tiempo y la temperatura de incubación de la Detection Solution y la Blue Spot Solution
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 Detection Solution o la Blue Spot Solution demasiado corto	Aumentar el tiempo de incubación de la Detection Solution y la Blue Spot Solution
	Amplificación de PCR débil/mala calidad de la plantilla de ADN	Comprobar la plantilla de ADN
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

Nuestros expertos están a su disposición para resolver cualquier duda. Póngase en contacto con help@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