




## VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0

REF ES-0008-50  50 test

Per l'amplificazione di sequenze specifiche micobatteriche



Dispositivo medico – diagnostico in vitro  
in conformità alla Direttiva UE 98/79/EC

### 1. Scopo previsto

Il kit VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 è specifico per amplificare e biotinilare, tramite PCR (Polymerase Chain Reaction), sezioni specifiche dell'ITS e, nel caso del M. tuberculosis complex, la regione IS6110 e la regione SR4 (Zozaya-Valdés et al 2017) del genoma micobatterico in campioni di DNA estratti per esempio da campioni clinici, strisci polmonari e campioni in coltura.

Il kit VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 è progettato per l'amplificazione di micobatteri, includendo, ma non limitandosi, a quelli rilevati dal corrispettivo VisionArray MYCO Chips e, se presenti nel campione di DNA, sequenze genomiche del gene umano HLA-DQA1 come controllo positivo.

Il kit VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 deve essere utilizzato con il kit VisionArray Detection Kit e il corrispondente VisionArray MYCO Chips. L'analisi automatica deve essere condotta utilizzando un VisionArray Analysis Package.

Il prodotto è progettato per un uso diagnostico in vitro (in conformità alla direttiva UE 98/79/CE). L'interpretazione dei risultati deve essere condotta da un patologo qualificato, analizzando il contesto della storia clinica del paziente nel rispetto degli altri dati clinici e patologici del paziente.

### 2. Rilevanza clinica

Fare riferimento alle istruzioni d'uso del rispettivo chip.

### 3. Principio del metodo

Utilizzando la PCR (Polymerase Chain Reaction), le sequenze di DNA possono essere amplificate selettivamente. Il principio su cui si basa la PCR consiste nel ripetersi di un ciclo da tre passaggi: denaturazione, annealing e prolungamento. La ripetizione di questi passaggi porta all'amplificazione esponenziale delle sequenze target.

Il primo passaggio di ciascun ciclo è la denaturazione, nel quale il riscaldamento della miscela di reazione porta alla separazione dei filamenti di DNA. Durante l'annealing, primer complementari si legano alla singola catena di DNA. I primer fiancheggiano le sequenze target e fungono da punti di partenza per l'integrazione dei nucleotidi nella fase di prolungamento, creando copie identiche al DNA modello. I primer utilizzati in questo kit sono marcati con biotina. Di conseguenza, ciascun nuovo prodotto di PCR è automaticamente biotinilato per la successiva rivelazione.

Per evitare la contaminazione con i prodotti di amplificazione della PCR, sono inclusi nel VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 anche nucleotidi uracile. Eseguendo un passaggio con Uracil-DNA-glicosilasi prima della PCR, è possibile rimuovere tutte le sequenze che contengono uracile e quindi possibili contaminazioni con prodotti di PCR di precedenti PCR VisionArray. L'Uracil-DNA-glicosilasi è inattivata a temperature superiori ai 95°C, quindi la reazione di PCR può poi essere eseguita, come solito.

### 4. Reagenti forniti

Il kit VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 è costituito da:

- VisionArray MYCO Primer
- Taq DNA Polimerasi
- Uracil-DNA Glicosilasi
- H<sub>2</sub>O
- MgCl<sub>2</sub>
- PCR-Buffer
- Soluzione dNTP/dUTP

Il kit VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 è disponibile in un unico formato:

- ES-0008-50: 0.75 ml (50 reazioni da 15 µl ciascuna)

### 5. Materiali richiesti ma non forniti

#### Reagenti:

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

#### Attrezzatura:

- Provette per PCR
- Termociclatore
- Pipette
- VisionArray MYCO Chip 1.0 (VA-0003) o VisionArray MYCO Chip 2.0 (VA-0005)
- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) o VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)

*Nota: I VisionArray Analysis Package devono contenere un VisionArray MYCO Chip File per un buon risultato.*

### 6. Conservazione e stoccaggio

Il VisionArray HPV PreCise Master Mix deve essere conservato a -16/-22°C in posizione verticale. Se vengono seguite queste condizioni di conservazione, il prodotto sarà performante, senza perdere le proprie caratteristiche, almeno fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

Ridurre al minimo i passaggi di congelamento-scongelo, con un massimo di 10 cicli, stoccando il prodotto in aliquote. Dopo l'apertura della provetta, utilizzare il prodotto entro 6 mesi.

I prodotti di PCR devono essere tenuti a temperatura ambiente per il più breve tempo possibile.

### 7. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'uso.
- Non utilizzare i reagenti una volta superata la data di scadenza.
- Evitare qualsiasi cross-contaminazione e contaminazione micobatterica dei reagenti.
- Non dispensare mai le soluzioni con la bocca.
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per utilizzatori professionali.
- Per evitare la contaminazione è necessario separare i luoghi in cui vengono eseguiti i passaggi con e senza DNA e utilizzare piani di lavoro puliti per la preparazione del master mix di PCR.

## 8. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- L'interpretazione dei risultati deve essere condotta da un patologo qualificato, considerando il contesto della storia clinica del paziente, rispettando gli altri dati clinici e patologici.
- È importante utilizzare il quantitativo indicato di reagenti per evitare di danneggiare la reazione.
- Ripetuti scongelamenti e congelamenti dei campioni di DNA possono danneggiare la reazione di rivelazione.

## 9. Sostanze interferenti

- Bassa efficienza di PCR per inibizione di PCR da parte della materia prima del DNA (per esempio: sangue).
- Una concentrazione elevata di EDTA nei buffer di eluizione potrebbe comportare un'inibizione della PCR. Utilizzare solo il quantitativo raccomandato di DNA.

## 10. Preparazione dei campioni

Come materiali di partenza per la genotipizzazione micobatterica possono essere utilizzati campioni di DNA estratti ad esempio da campioni clinici, strisci polmonari o campioni in coltura.

Dopo l'estrazione, è necessario effettuare una misurazione della concentrazione di DNA per controllarne la qualità e la quantità. Ogni campione dovrebbe avere una concentrazione almeno pari a 15 ng/ $\mu$ l con un elevato grado di purezza (260/280: ~1.8).

Evitare di contaminare il DNA durante le procedure di estrazione. Quando si taglia al microtomo, le sezioni dovrebbero essere inserite immediatamente in una provetta di reazione subito dopo il taglio. La lama da microtomia dovrebbe essere cambiata tra un campione e l'altro. Utilizzare le stesse precauzioni per campioni di tessuto già montati su vetrino. Cambiare lo scraper dopo ciascun campione.

## 11. Trattamento preparatorio del prodotto

Come primo passaggio, definire la quantità di cicli di PCR (n) necessari, che risulta dalla quantità di DNA campione più un controllo negativo (miscela di reazione senza DNA template).

### Schema di dispensazione:

No.	Reagenti	1x (conc. finale)	nx
1	<u>VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0</u>	15 $\mu$ l	
2	Campione di DNA	2.5-5 $\mu$ l	
3	H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l	
	<b>Volume totale</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	

- Aliquotare il VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 nelle provette per PCR DNA/DNasi free.
- Dispensare il campione di DNA nel Master Mix (No. 2 nello schema di dispensazione). Per il controllo negativo, aggiungere 10  $\mu$ l di acqua DNA/DNasi free.
- Se necessario, aggiungere acqua per raggiungere il volume di reazione finale di 25  $\mu$ l (No. 3 nello schema di dispensazione).
- Trasferire i campioni in un termociclatore preriscaldato e calibrato.

## 12. Procedura di lavoro

Il protocollo di amplificazione descritto in questa scheda è stato stabilito utilizzando vial per PCR da 0.2 ml, utilizzando gli enzimi raccomandati su un termociclatore Biometra TProfessional Thermocycler System. Se necessario, se si utilizza un altro tipo di termociclatore, possono essere apportate modifiche, in accordo con il produttore. Deve essere testata la compatibilità di questo protocollo, prima dell'uso. Il termociclatore utilizzato deve essere calibrato in accordo alle linee guida definite dal produttore.

### Profilo termico:

Tempo	Temperatura	Ripetizioni	Passaggio
10 min.	25°C	x1	Incubazione con Uracil-DNA Glicosilasi
10 min.	95°C	x1	Attivazione della HotStart <i>Taq</i> Polimerasi, Disattivazione della Uracil-DNA Glicosilasi
20 s	95°C	x35	Denaturazione
90 s	60°C		Annealing e allungamento
60 s	95°C	x1	Denaturazione
$\infty$	10°C	x1	

Velocità di incremento temperatura:  $\Delta$  5°C/s

Il profilo termico è ottimizzato per i reagenti raccomandati in questa scheda. Modifiche alla composizione chimica o di settaggio devono essere validate dall'utilizzatore prima dell'uso.

Una volta che la PCR è terminata, la provetta di reazione va conservata a -16°C / -22°C.

## 13. Interpretazione dei risultati

Il kit VisionArray MYCO PreCise Master Mix 2.0 deve essere utilizzato con un VisionArray MYCO Chip e con il kit VisionArray Detection Kit. L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita con l'aiuto del rispettivo VisionArray Analysis Package.

## 14. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Per monitorare che i campioni processati e i reagenti mantengano le corrette performance, ogni test deve essere condotto associato a campioni di controllo esterni validati positivi e negativi. Se i campioni esterni e/o interni non si colorano correttamente, il risultato con il campione del paziente non deve essere ritenuto valido.

Il controllo della PCR e degli amplificati può essere monitorato poi tramite separazione elettroforetica in gel d'agarosio. La lunghezza del frammento delle specie micobatteriche è, rispettivamente, pari a 212 – 314 bp per le sezioni della regione ITS e pari a 122 bp per la regione IS6110 del *M. tuberculosis* complex. Il controllo positivo mostra una banda a 227 bp.

A causa delle condizioni di PCR che favoriscono i prodotti a singola catena, non sono presenti bande nette in ogni test. Ad ogni modo, è possibile che l'ibridazione abbia comunque avuto successo. Vedere la sezione di risoluzione dei problemi per ulteriori dettagli.

## 15. Caratteristiche di performance

Fare riferimento alle caratteristiche di performance del rispettivo VisionArray MYCO Chip 1.0.

## 16. Smaltimento

Smaltire i reagenti in accordo a quanto previsto dalle disposizioni locali vigenti.

## 17. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica alle istruzioni d'uso può comportare un risultato diverso nella rilevazione delle sequenze target.

Problema	Possibile causa	Azione
Prodotto di amplificazione mancante o scarso	Reagenti di PCR scaduti o deteriorati; programma del termociclatore errato.	Controllare i reagenti di PCR e il programma del termociclatore.
	Modello di DNA degradato; bassa resa di DNA.	Conservare il DNA a -16 / -20°C; evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti; utilizzare protocolli di estrazione alternativi.
	Inibitori di PCR nel mix di reazione.	Utilizzare protocolli di estrazione alternativi.
Amplificati di PCR nel controllo negativo	Contaminazione dei reagenti durante la preparazione del campione o durante l'impostazione della PCR.	Utilizzare reagenti nuovi; evitare la contaminazione dei campioni.

## 18. Letteratura

- Griffith D.E., et al (2007) Am J Respir Crit Care Med. 175(4):367-416
- Official statement of the american thoracic society (1997), Am J Respir Crit Care Med. 156(2 Pt 2):S1-25
- Simons S., et al (2011) Emerg Infect Dis. 17(3):343-9
- Gupta R.S., et al (2018) doi: 10.3389/fmicb.2018.00067
- Oren A. and Garrity G. (2018) Int J Syst Evol Microbiol 68:1411–1417
- Zozaya-Valdés E., et al (2017) J Clin Microbiol 55:1847–1856.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande. Contattare per cortesia [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



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

### Distribuito da:

ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Germania  
Phone: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
www.zytovision.com  
Email: info@zytovision.com

### Marchi registrati:

VisionArray® è un marchio registrato di  
42 life sciences GmbH & Co. KG