



## VisionArray HPV High Risk Chip 1.0

REF	VA-0002-10	Σ	10 test
REF	VA-0002-50	Σ	50 test

Per la rivelazione specifica di 24 tipi di Papilloma Virus umano (HPV) prodotti con l'aiuto del VisionArray HPV PreCise Master Mix.



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

### 1. Scopo previsto

Il VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 deve essere utilizzato con un VisionArray Analysis Package per la rivelazione qualitativa e la genotipizzazione degli amplificati PCR di 24 tipi, clinicamente rilevanti, di Papilloma Virus umano (HPV) con genotipo ad alto rischio o probabilmente ad alto rischio, prodotti con l'aiuto del VisionArray HPV PreCise Master Mix.

Questo prodotto è progettato per un uso diagnostico in vitro (in conformità alla direttiva EU 98/79/EC). 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

Le infezioni da HPV sono comuni e rappresentano un fattore di rischio maggiore per lo sviluppo ad esempio del tumore cervicale. Al momento, sono stati descritti più di 150 differenti tipi di HPV. In base al loro rischio di indurre il cancro, sono divisi in tipo a Basso Rischio (LR), probabilmente ad Alto Rischio e ad Alto Rischio (HR).

Il VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 è progettato per la rivelazione dei seguenti 24 genotipi ad Alto Rischio e probabilmente ad Alto Rischio:

#### Classificazione dei 24 genotipi di HPV sul VisionArray HPV High Risk Chip 1.0

Alto rischio	Probabilmente ad Alto Rischio
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	26, 34, 53, 66, 67, 68a, 68b, 69, 70, 73, 82IS39, 82MM4

I tipi di HPV sono classificati in conformità alla letteratura scientifica attuale.

### 3. Principio del metodo

I frammenti di DNA con una sequenza specifica sono rivelati tramite un pool di frammenti di DNA su un vetrino con chip, grazie a sequenze di DNA immobilizzate per ibridazione DNA/DNA. Possono essere utilizzati, come materiale d'origine per questo sistema di rivelazione, sia campioni provenienti da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina che da campioni cellulari. Come primo passaggio, le sequenze target di questi campioni devono essere amplificate e biotinite tramite PCR. L'ibridazione tra le sequenze amplificate e il DNA complementare avviene in seguito. Dopo l'ibridazione, il DNA legato in modo aspecifico viene lavato via con alcuni rapidi lavaggi stringenti. Le sequenze specifiche biotinite sono poi marcate con un complesso streptavidina-perossidasi e visualizzate con una colorazione di tetrametilbenzidina (TMB).

### 4. Reagenti forniti

Sono inclusi i seguenti reagenti:

Codice	Componenti	Quantità	
		10	50
VA-0002	VisionArray HPV High Risk Chip 1.0	10	5x10
	Istruzioni per l'uso	1	1

#### Descrizione del Chip:

Posizione delle sequenze di cattura sul chip:

GD								GD
		+						
	16	18	26	31	39	35	34	33
	45	51	52	53	66	59	58	56
	67	68a	68b	69	82 MM4	82 IS39	73	70
	39	35	34	33	16	18	26	31
	66	59	58	56	45	51	52	53
	82 MM4	82 IS39	73	70	67	68a	68b	69
							+	
GD								

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

### 5. Materiali richiesti ma non forniti

- 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)

I VisionArray Analysis Package devono contenere il VisionArray HPV High Risk Chip File 1.0 (E-4202) per una scansione efficace.

### 6. Conservazione e stoccaggio

I chip devono essere conservati nella confezione originale integra a una temperatura di -16/-22°C. Se queste condizioni di conservazione sono garantite, i chip sono stabili, senza perdita di performance, almeno fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Dopo aver aperto la confezione originale, conservare a -16/-22°C e utilizzare i chip entro due mesi.

## 7. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'uso
- Non utilizzare i chip una volta superata la data di scadenza.
- I chip dovrebbero essere utilizzati in un ambiente pulito, privo di polvere. Evitare di contaminare la superficie del chip con polvere o altre particelle.
- Evitare il contatto diretto con la superficie del chip.
- Solo il lato marcato del vetrino può essere utilizzato per l'ibridazione.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni per evitare risultati errati.

## 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.
- Il chip dovrebbe essere utilizzato solo per la rivelazione dei tipi di HPV indicati nel paragrafo 2. "Rilevanza clinica".

Inoltre, i seguenti passaggi possono influenzare il sistema di rivelazione:

- Deviazioni dal protocollo di rivelazione proposto (per esempio: temperature o volume dei reagenti).
- Bassa concentrazione o DNA degradato.
- Materia prima non appropriata.
- Uso di strumenti non calibrati o danneggiati.
- Nel caso di infezioni importanti da HPV o di infezioni multiple, l'intensità del controllo positivo della PCR potrebbe essere ridotta.
- Non lavorare sotto flusso laminare, poiché ciò potrebbe portare a una compromissione dei risultati.

## 9. Sostanze interferenti

- Bassa efficienza di PCR per inibizione di PCR da parte della materia prima del DNA (per esempio: sangue).
- Uso di additivi di PCR che possano influenzare l'ibridazione (e.g. DMSO, betaina, urea).

## 10. Preparazione dei campioni

I prodotti di partenza per questo sistema di rivelazione sono amplificati di PCR che sono stati prodotti con il VisionArray HPV PreCise Master Mix.

L'ibridazione e la rivelazione dei chip devono essere condotte utilizzando il kit VisionArray Detection Kit in accordo con le istruzioni per l'uso.

## 11. Trattamento preparatorio del prodotto

Portare i chip a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso.

## 12. Procedura di lavoro

Effettuare la scansione in accordo con le istruzioni d'uso del rispettivo VisionArray Analysis Package.

## 13. Interpretazione dei risultati

Con l'aiuto del VisionArray HPV High Risk Chip 1.0, è possibile determinare qualitativamente la presenza o l'assenza di uno o più dei 24 tipi di HPV nel campione analizzato.

L'intensità dei segnali è influenzata dalla prevalenza delle sequenze target nel campione così come da diversi fattori pertinenti al sistema di rivelazione. L'intensità del numero assoluto dei segnali non può essere utilizzata per fare un'analisi quantitativa la concentrazione del DNA.

### Valutazione dei risultati con software

L'analisi automatica dei risultati può essere condotta utilizzando il rispettivo VisionArray Analyzer Software. Il software include un manuale d'uso completo per l'analisi dei chip.

## 14. Procedure di Controllo qualità raccomandate

### Controlli interni:

- Punti guida / controllo d'ibridazione (GD): questi spot sono utilizzati dal rispettivo VisionArray Analyzer Software per il posizionamento della griglia. Inoltre, la colorazione degli spot guida prova che l'ibridazione, la marcatura e la colorazione abbiano avuto successo ed è utilizzata per calcolare la relativa intensità dei segnali.
- Controllo positivo / controllo di PCR (+): questi controlli sono utilizzati per la valutazione della reazione di PCR e per la qualità del PCR-template.
- Tutte le sequenze di cattura e il controllo positivo sono posizionati sul chip come duplicati e gli spot guida come triplicati. I segnali sono visibili sul chip come segnali circolari di ibridazione.

### Controlli esterni:

Per monitorare le corrette performance dei campioni processati e dei reagenti, ogni test dovrebbe essere accompagnato da un controllo esterno validato positivo e negativo. Se un controllo positivo e/o negativo non mostra una colorazione appropriata, i risultati con il campione del paziente non devono essere considerati validi.

## 15. Caratteristiche di performance

### 15.1 Performance analitica:

Le specificità e sensibilità analitiche del VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 sono state testate separatamente per ciascuna delle 24 sequenze di cattura insieme a 17 tipi di HPV a basso rischio. Per questo scopo sono state testate sequenze plasmidiche verificate con una concentrazione di 50-500.000 equivalenti genomici (GEQ). In un esperimento aggiuntivo, WHO ha approvato gli standard utilizzati per la valutazione di HPV 16 e HPV 18. I risultati dei test con diluizioni di plasmidi e dei test con standard approvati dall'OMS erano coerenti.

### Specificità e limiti di rivelazione per tutti i 24 tipi di HPV

Tipo di HPV	Specificità [%]	Limite di rivelazione (GEQ)
16 (HR)	100	50
18 (HR)	100	50
26	100	500
31 (HR)	100	500
33 (HR)	100	50
34	100	50
35 (HR)	100	50
39 (HR)	100	50
45 (HR)	100	50
51 (HR)	100	50
52 (HR)	100	500
53	100	500
56 (HR)	100	50
58 (HR)	100	500
59 (HR)	100	5,000
66	100	500
67	100	50
68a	100	5,000
68b	97,6	500
69	100	500
70	100	50
73	100	5,000
82IS39	100	50
82MM4	100	500

La sensibilità del sistema di analisi è stata testata per ciascun tipo di HPV separatamente. La sensibilità dipende dalla quantità e dall'efficienza dei cicli di PCR e dall'affinità delle sonde di cattura.

La sensibilità determinata si riferisce alla rivelazione di una singola sequenza target. La rivelazione di un'infezione multipla può comportare un indebolimento della sensibilità per alcuni tipi di HPV, a causa della competizione durante la reazione di PCR, in particolar modo nei campioni che contengono concentrazioni molto diverse tra loro.

La performance è stata validata utilizzando le procedure descritte nelle istruzioni per l'uso. Modifiche a queste procedure potrebbero alterare la performance e devono quindi essere validate dall'utilizzatore.

**15.2 Cross ibridazioni:**

- Se presente in elevate concentrazioni, l'HPV 68a si ibrida all'HPV 68b nel 50% dei casi. Con concentrazioni più basse, non si osservano cross-ibridazioni. Comunque, l'HPV 68b è un sottotipo e perciò in elevate concentrazioni non è distinguibile dall'HPV 68a.

**15.3 Cutoff**

Per la valutazione dei risultati, la dimensione dello spot è settata a 50.

Il limite (cutoff) è settato a 25 per l'immagine in scala di grigio della dimensione dello spot. Un segnale al di sotto di questo valore è considerato background dal rispettivo VisionArray Analyzer Software.

**16. Smaltimento**

Lo smaltimento dei reagenti deve essere effettuato in conformità alle regolamentazioni 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
Nessun segnale	Temperatura sbagliata	Controllare la temperatura di ibridazione
	Reagenti scaduti	Controllare i reagenti
Solo spot guida e nessun altro segnale	Problemi con il prodotto di PCR (PCR non abbastanza efficiente o DNA template degradato)	Controllare l'efficienza della PCR con un controllo positivo; Controllare i reagenti della PCR e il programma del termociclatore; Controllare i prodotti della PCR in gel d'agarosio
	Materie prime errate	Controllare le materie prime
	Errata combinazione di chip e campioni	Controllare la combinazione di chip e campione
Solo gli spot guida e il controllo di PCR, ma nessun altro segnale	Nessuna sequenza target presente	Usare un controllo positivo
Solo gli spot guida e i segnali HPV, ma nessun controllo positivo	Infezione da HPV importante o infezione da HPV multipla	Diluire il campione di DNA
	Campione degradato	Nuova estrazione del DNA; conservare tra -16 e -22°C
Troppo background	Tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution troppo lungo; temperatura troppo elevata durante l'incubazione	Controllare il tempo di incubazione e la temperatura della soluzione di rivelazione o della Blue Spot Solution
	Vetrini non asciugati adeguatamente	Controllare il passaggio di asciugatura
Segnali forti o persi	Tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution troppo lungo	Aggiustamento progressivo del tempo e della temperatura di incubazione nella soluzione di rivelazione e nella Blue Spot Solution
Segnali deboli	Temperatura di ibridazione non corretta	Controllare la temperatura
	Tempo di ibridazione troppo corto	Allungare il tempo di ibridazione fino a un massimo di 30 minuti
	Tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution troppo breve	Allungare il tempo di incubazione nella soluzione di rivelazione o nella Blue Spot Solution
	Amplificazione PCR debole/cattiva qualità del DNA Template	Controllare il DNA template
Cross-ibridazione dei segnali,	Contaminazione dei reagenti di PCR o del prodotto di PCR	Sostituzione dei reagenti di PCR in uso

segnali falsi positivi	Contaminazione durante la preparazione della PCR o della miscela di ibridazione	Evitare di trasferire i campioni durante la preparazione della miscela
	Temperatura di ibridazione troppo bassa	Controllare la temperatura di ibridazione
	Diversi chip incubati per un tempo troppo lungo nello stesso tampone di lavaggio	Velocizzare i tempi di lavaggio
Segnale singolo anziché doppio	Eliminazione meccanica del secondo segnale, per esempio per contatto con il puntale della pipetta	Evitare il contatto diretto con la superficie del vetrino
	Copertura irregolare della zona di array per la formazione di bolle	Applicare le soluzioni evitando la formazione di bolle
	Segnali deboli vicini al limite (1 sopra e 1 sotto)	Ripetere la PCR e rivelare seguendo le condizioni indicate nel manuale d'uso

**18. Letteratura**

- 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.

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