



VisionArray HPV High Risk Chip 1.0

REF	VA-0002-10	Σ	10 testów
REF	VA-0002-50	Σ	50 testów

Do specyficznej detekcji 24 typów wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV), które zostały wyprodukowane przy pomocy VisionArray HPV PreCise Master Mix.



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*
zgodnie z dyrektywą 98/79/WE

1. Przeznaczenie

VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 jest przeznaczony do stosowania z VisionArray Analysis Package do jakościowego wykrywania amplifikatów reakcji PCR 24 istotnych klinicznie genotypów wysokiego ryzyka i prawdopodobnie wysokiego ryzyka wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV), które zostały wyprodukowane przy pomocy VisionArray HPV PreCise Master Mix.

Produkt jest przeznaczony do diagnostyki *in vitro* (zgodnie z dyrektywą UE 98/79/EC). Interpretacja wyników musi być dokonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście historii klinicznej pacjenta, w odniesieniu do dalszych danych klinicznych i patologicznych pacjenta.

2. Znaczenie kliniczne

Zakażenia HPV są powszechne i stanowią główny czynnik ryzyka rozwoju np. raka szyjki macicy. Obecnie opisano ponad 150 różnych typów HPV. W zależności od ryzyka wywołania raka są one podzielone na typy niskiego ryzyka (LR), prawdopodobnie wysokiego ryzyka i wysokiego ryzyka (HR).

VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 został zaprojektowany do wykrywania następujących 24 genotypów wysokiego i prawdopodobnie wysokiego ryzyka:

Klasyfikacja 24 genotypów HPV w VisionArray HPV High Risk Chip 1.0

Wysokiego Ryzyka (HR)	Prawdopodobnie Wysokiego Ryzyka
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	26, 34, 53, 66, 67, 68a, 68b, 69, 70, 73, 82IS39, 82MM4

Typy HPV zostały sklasyfikowane zgodnie z aktualną literaturą naukową.

3. Zasada testu

Fragmety DNA o określonej sekwencji są wykrywane z puli fragmentów DNA na szklanej macierzy za pomocą unieruchomionych sekwencji wychwytyjących DNA przez hybryzację DNA / DNA. Do tego systemu wykrywania można stosować materiał wyjściowy z próbek utrzalonych w formalinie i zatopionych w parafinie lub komórek. W pierwszym etapie sekwencje docelowe w tych próbkach muszą być amplifikowane i biotynylowane w reakcji PCR. Hybrydyzacja między amplifikowanymi sekwencjami i komplementarnymi wychwytyjącymi fragmentami DNA jest przeprowadzana później. Po hybrydyzacji niespecyficznie związany DNA jest wypłukiwany przez krótkie i ostre etapy przemywania. Specyficznie związane biotynylowane sekwencje są następnie znakowane wtórnie za pomocą koniugatu streptawidyna-peroksydaza i wizualizowane przez barwienie tetrametylobenzodyną (TMB).

4. Dostarczone odczynniki

Następujące składniki są zawarte:

Nr. kat.	Składniki	Liczba testów	
		10	50
VA-0002	VisionArray HPV High Risk Chip 1.0	10	5x10
	Instrukcja użycia	1	1

Opis macierzy:

Położenie sekwencji wychwytyjących na macierzy:

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. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

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

VisionArray Analysis Packages do prawidłowego skanowania musi zawierać pliki VisionArray HPV High Risk Chip File 1.0 (E-4202).

6. Przechowywanie i obsługa

Macierze muszą być przechowywane w nienaruszonym oryginalnym opakowaniu w temperaturze -16...-22°C. Jeśli te warunki przechowywania są przestrzegane, macierze są stabilne bez utraty wydajności przynajmniej do daty ważności wydrukowanej na etykiecie.

Po otwarciu oryginalnego opakowania przechowywać w temperaturze -16... -22 ° C i użyć produktu w ciągu dwóch miesięcy.

7. Ostrzeżenie i środki ostrożności

- Przeczytaj instrukcję użytkowania przed użyciem!
- Nie stosować macierzy po przekroczeniu daty ważności!
- Macierze należy stosować w warunkach bezpyłowych. Należy unikać zanieczyszczenia powierzchni macierzy pyłem, kurzem lub innymi cząstkami!
- Należy unikać bezpośredniego kontaktu z polem na powierzchni macierzy!
- Tylko oznaczona strona szkiełka może być użyta do hybrydyzacji.
- Należy unikać krzyżowego zanieczyszczenia próbki, które może prowadzić do błędnych wyników.

8. Ograniczenia

- Do zastosowań w diagnostyce *in vitro*.
- Tylko do użytku profesjonalnego.
- Interpretacja wyników musi być dokonana w kontekście historii klinicznej pacjenta w odniesieniu do dalszych danych klinicznych i patologicznych przez wykwalifikowanego patologa.
- Macierz powinna być używana tylko do wykrywania typów HPV opisanych w punkcie 2. „Znaczenie kliniczne”.

Ponadto następujące czynniki mogą wpływać na system wykrywania:

- Odchylenie od proponowanego protokołu detekcji (np. temperatura lub objętość odczynników).
- Zdegradowane lub o niskim stężeniu DNA materiału.
- Niewłaściwy materiał wyjściowy.
- Stosowanie nieskalibrowanego lub uszkodzonego wyposażenia.
- W przypadku silnych zakażeń HPV lub w przypadku wielu zakażeń intensywność kontroli pozytywnej PCR może być osłabiona.
- Nie pracować przy włączonym laminarze podczas przeprowadzania procedury testu, ponieważ może to prowadzić do pogorszenia wyników.

9. Substancje zakłócające

- Niska wydajność reakcji PCR spowodowana inhibitorami PCR w materiale wyjściowym (np. krwi).
- Zastosowanie dodatków PCR, które mogłyby wpłynąć na hybrydyzację (np. DMSO, betaina, mocznik).

10. Przygotowanie próbek

Materiałem wyjściowym dla tego systemu wykrywania są produkty amplifikacji PCR, które zostały wyprodukowane przy użyciu VisionArray HPV PreCise Master Mix.

Hybrydyzacja i detekcja na macierzy musi być wykonana za pomocą zestawu VisionArray Detection Kit zgodnie z instrukcją użytkowania.

11. Obróbka wstępna produktu

Przed użyciem przenieść szkiełka z matrycą do temperatury pokojowej (18...25°C).

12. Procedura testu

Wykonać skanowanie zgodnie z instrukcjami użytkowania odpowiedniego zestawu do analizy VisionArray Analysis Package.

13. Interpretacja wyników

Z pomocą VisionArray HPV High Risk Chip 1, możliwe jest uzyskanie jakościowego stwierdzenia obecności lub braku jednego lub więcej z 24 typów HPV w badanej próbce.

Na intensywność sygnałów wpływa dominacja sekwencji docelowych w próbce, a także różne czynniki systemu detekcji. Bez względu na liczbę intensywności sygnału nie można użyć do kwantyfikacji stężenia DNA.

Ocena oparta na oprogramowaniu

Zautomatyzowaną ocenę wyników wykonuje odpowiednie oprogramowanie VisionArray Analyzer Software. Obszerny podręcznik do analizy macierzy jest dołączony do oprogramowania.

14. Rekomendowane procedury kontroli jakości

Wewnętrzne kontrole:

- Punkty nawigacyjne / Kontrola hybrydyzacji (GD): Te punkty są używane przez odpowiednie oprogramowanie VisionArray Analyzer Software do pozycjonowania siatki. Dodatkowo, barwienie kropek prowadzących jest dowodem na pomyślną reakcję hybrydyzacji, znakowania i reakcji barwienia oraz jest wykorzystywane do obliczania względnej intensywności sygnałów.
- Pozytywna kontrola/kontrola PCR (+): Kontrole te są wykorzystywane do oceny reakcji PCR i jakości matrycy PCR.
- Wszystkie sekwencje wychwytyjące na macierzy i kontrola pozytywna są ustawione na siatce jako duplikaty, a kropki nawigacyjne jako triplet. Sygnały są widoczne na macierzy jako kołowe sygnały hybrydyzacji.

Zewnętrzne kontrole:

Aby monitorować prawidłowe działanie przygotowanych próbek i odczynników testowych, każdemu testowi powinny towarzyszyć zewnętrzne zwalidowane próbki kontroli pozytywnej i negatywnej. Jeśli jakkolwiek kontrola wewnętrzna i / lub zewnętrzna nie wykaże odpowiedniego barwienia, wyniki z próbkami pacjenta należy uznać za nieważne.

15. Charakterystyka wydajności

15.1 Wydajność i analityczna:

Analityczna specyficzność i czułość VisionArray HPV High Risk Chip 1.0 każdego z 24 wychwytyjących sekwencji HPV była testowana osobno wraz z 17 typami HPV niskiego ryzyka. W tym celu przetestowano sekwencje plazmidów o stężeniu 50-500000 równoważników genomu (GEQ). W dodatkowym eksperymencie do oceny HPV 16 i HPV 18. zastosowano standardy zatwierdzone przez WHO. Wyniki testów z rozcieńczeniami plazmidów i testów z normami zatwierdzonymi przez WHO były spójne.

Specyficzność i granica wykrywalności dla wszystkich 24 typów HPV

Typ HPV	Specyficzność [%]	Granica wykrywalności (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

Czułość systemu analizy została przetestowana osobno dla każdego typu HPV. Czuość zależy od ilości i wydajności cykli PCR oraz powinowactwa do elementu wychwytyjącego.

Określona czułość dotyczy wykrywania pojedynczej sekwencji docelowej. Detekcja wielokrotnego zakażenia może prowadzić do osłabienia czułości niektórych typów HPV z powodu współzawodniczenia w reakcji PCR, zwłaszcza w mieszanych próbkach z silną różnicą stężenia.

Działanie zostało zatwierdzone przy użyciu procedur opisanych w niniejszej instrukcji użytkowania. Modyfikacje tych procedur mogą zmienić wydajność i muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

15.2 Krzyż owe hybrydyzacje:

- W przypadku wysokich stężeń HPV 68a hybryduje z HPV 68b w 50% przypadków. W niższych stężeniach może na zaobserwować brak krzyżowej hybrydyzacji. Jednak HPV 68b jest subtypem i dlatego w wysokich stężeniach nie może odróżnić od HPV 68a.

15.3 Odcięcie

Do oceny wyników rozmiar kropki jest ustawiony na 50.

Próg (odcięcie) został ustawiony na 25 dla obrazu w skali szarości tego rozmiaru kropki. Sygnał poniżej tej wartości jest uważany za tło przez odpowiednie oprogramowanie VisonArray Analyzer Software.

16. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbyć się zgodnie z lokalnymi przepisami.

17. Rozwiązywanie problemów

Wszelkie odstępstwa od instrukcji obsługi mogą prowadzić do pogorszenia reakcji wykrywania sekwencji docelowej.

Problem	Możliwa przyczyna	Działanie
Brak sygnału	Zła temperatura	Sprawdź temperaturę hybrydyzacji
	Przetknięte odczynniki	Sprawdź odczynniki
Tylko sygnały nawigacyjne i żadne inne	Problemy z produktami PCR (PCR nie jest wystarczająco wydajny lub matryca DNA uległa degradacji)	Sprawdź wydajność PCR z kontrolą pozytywną; Sprawdź odczynniki do PCR i program termocyklera; Sprawdź produkt PCR w żelu agarozowym
	Niewłaściwy materiał wyjściowy	Sprawdź materiał wyjściowy
	Niewłaściwa kombinacja matrycy i próbki	Sprawdź kombinację próbki/matrycy
Tylko sygnały nawigacyjne i kontrole PCR obecne oraz żadne inne sygnały	Brak sekwencji docelowej	Zastosuj kontrolę pozytywną
Tylko sygnały nawigacyjne i sygnały HPV obecne oraz brak kontroli pozytywnej	Silna infekcja HPV lub infekcja wielokrotna HPV	Rozcieńcz próbkę DNA
	Zdegradowana próbka	Nowa ekstrakcja DNA; przechowywać w temperaturze -16...-22°C
Za duże tło	Zbyt długa inkubacja z Detection Solution lub Blue Spot Solution; zbyt wysoka temperatura w czasie inkubacji	Sprawdź czas i temperaturę inkubacji z Detection Solution i Blue Spot Solution
	Szkiełka nie są odpowiednio wysuszone	Sprawdź krok suszenia
Zbyt silne sygnały	Zbyt długa inkubacja z Detection Solution lub Blue Spot Solution; zbyt wysoka temperatura w czasie inkubacji	Stopniowa regulacja czasu inkubacji i temperatury z Detection Solution i Blue Spot Solution
Słabe sygnały	Niewłaściwa temperatura hybrydyzacji	Sprawdź temperaturę
	Zbyt krótki czas hybrydyzacji	Wydłuż czas hybrydyzacji do maksymalnie 30 min
	Zbyt krótki czas inkubacji z Detection Solution lub Blue Spot Solution	Wydłuż czas inkubacji z Detection Solution lub Blue Spot Solution
	Słaba amplifikacja PCR/zła jakość matrycy DNA	Sprawdź matrycę DNA
Sygnały hybrydyzacji	Zanieczyszczenie odczynników do PCR lub produktów reakcji PCR	Wymień odczynniki do PCR

krzyż owej, sygnały fałszywie dodatnie	Zanieczyszczenie podczas przygotowywania do PCR lub mieszaniny hybrydyzacyjnej	Unikaj przenoszenia próbek podczas przygotowywania mieszaniny
	Zbyt niska temperatura hybrydyzacji	Sprawdź temperaturę hybrydyzacji
	Zbyt długa inkubacja kilku matrycy w tym samym buforze płuczącym	Szybkie wykonanie etapów płukania
Pojedyncze sygnały zamiast duplikatów	Mechaniczne usunięcie drugiego sygnału, np. podczas kontaktu z końcówką pipety	Unikać bezpośredniego kontaktu z powierzchnią matrycy
	Nieregularne pokrycie pola matrycy przez pęcherzyki powietrza	Nanieś roztwory bez pęcherzy powietrza
	Słabe sygnały wokół progu (1 powyżej i 1 poniżej)	Powtórz PCR i detekcję z uwzględnieniem warunków wymaganych w instrukcji

18. Literatura

- 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.

Nasi eksperci są gotowi odpowiedzieć na Państwa pytania. Prosimy o kontakt help@zytovision.com



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

Dystrybutor:

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

Znaki towarowe:

VisionArray® to znaki towarowe
42 life sciences GmbH & Co. KG