



## VisionArray HPV PreCise Master Mix

REF ES-0007-50  50 testes

Para a amplificação de sequências específicas do HPV



Dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*  
de acordo com a diretiva EU 98/79/CE

### 1. Utilização pretendida

O VisionArray HPV PreCise Master Mix destina-se a ser utilizado para amplificar e biotinar secções específicas da região L1 dos genomas do Vírus do Papiloma Humano (HPV) por reação em cadeia da polimerase (PCR).

O VisionArray HPV PreCise Master Mix foi concebido para amplificar os tipos de HPV, incluindo, entre outros, os detetados pelos correspondentes VisionArray HPV Chips e sequências genéticas do gene HLA-DQA1 humano como controlo positivo de PCR.

O VisionArray HPV PreCise Master Mix deve ser usado com o VisionArray Detection Kit e os correspondentes VisionArray HPV Chips. A análise automatizada deve ser realizada com o VisionArray Analysis Package.

Este produto foi desenvolvido para uso em diagnóstico *in vitro* (de acordo com a diretiva da UE 98/79/EC). A interpretação dos resultados deve ser feita dentro do contexto da história clínica do paciente, em relação com os dados clínicos e patológicos adicionais do paciente, por um patologista qualificado.

### 2. Relevância clínica

Consulte as instruções de utilização do respetivo chip.

### 3. Princípio de teste

Sequências de DNA podem ser amplificadas, seletivamente, por PCR. O princípio básico da PCR é baseado em um ciclo recorrente de 3 etapas: desnaturação, hibridação e extensão. A repetição dessas etapas leva a uma amplificação exponencial das sequências alvo.

O primeiro passo de cada ciclo é a desnaturação, onde o aquecimento da mistura de reação leva a cadeias simples de DNA. Durante a hibridação, os primers complementares ligam-se ao DNA de cadeia simples. Os primers flanqueiam a sequência alvo e servem como ponto de partida para a integração de nucleotídeos durante a fase de extensão, criando cópias idênticas do DNA padrão. Os primers usados neste kit

são marcados com uma molécula de biotina. Assim, cada novo produto de PCR é automaticamente biotinilado, o que posteriormente permite a deteção por anticorpos.

O VisionArray HPV PreCise Master Mix é um ajuste do sistema GP5/GP6 (Snijders et al., 1990) e é dirigido contra o gene L1, uma região altamente conservada do genoma do HPV. Dependendo do genótipo do HPV, a amplificação resulta em produtos de PCR com 139-148pb de comprimento.

Primers contra o gene humano HLA-DQA1 são recomendados pela OMS nos seus Manuais de Laboratório de Vírus do Papiloma Humano como controlo positivo e, portanto, também estão incluídos no VisionArray HPV PreCise Master Mix.

De modo a evitar a contaminação com produtos de amplificação por PCR, os nucleótidos de uracilo são incluídos no VisionArray HPV PreCise Master Mix. Ao realizar um passo de Uracilo-DNA-Glicosilase antes da PCR, todas as sequências que contêm bases de uracilo e, portanto, possíveis contaminações com produtos de PCRs do VisionArray anteriores, podem ser removidas. A Uracilo-DNA-Glicosilase é inativada por temperaturas superiores a 95°C, de modo a que a reação de PCR pode ser realizada como habitualmente.

### 4. Reagentes fornecidos

O VisionArray HPV PreCise Master Mix é composto por:

- VisionArray HPV Primer Mix 2.0
- VisionArray PreCise Taq DNA Polymerase
- VisionArray Uracil-DNA Glycosylase
- H<sub>2</sub>O
- MgCl<sub>2</sub>
- 10x tampão-PCR
- Solução dNTP/dUTP

O VisionArray HPV PreCise Master Mix está disponível na apresentação:

- ES-0007-50: 0.75 ml (50 reações de 15 µl cada)

### 5. Materiais necessários mas não fornecidos

#### Reagentes:

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

#### Equipamentos:

- Tubos PCR
- Termociclador
- Pipetas
- VisionArray HPV Chips (VA-0001; VA-0002)
- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) ou VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)

*Nota: O VisionArray Analysis Package deve conter um VisionArray HPV Chip File para uma correta digitalização.*

### 6. Armazenamento e manuseamento

O componente deve ser armazenado a -16 ... -22 ° C na posição vertical. Se estas condições de armazenamento forem seguidas, o kit funcionará, sem perda de desempenho, pelo menos até à data de validade impressa no rótulo.

O período de tempo que o produto de PCR está à temperatura ambiente deve ser o mais curto possível.

### 7. Avisos e precauções

- Ler as instruções antes de utilizar!
- Não utilizar reagentes após terminar a data de validade!
- Evitar a contaminação cruzada e contaminação bacteriana dos reagentes.
- Nunca pipetar soluções com a boca!
- Está disponível a ficha de dados de segurança, se solicitada, para utilização profissional.

- É necessária uma separação de salas entre etapas de trabalho com e sem DNA, bem como a utilização de bancadas limpas para a preparação da mistura principal de PCR para evitar contaminações.

## 8. Limitações

- Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para utilização profissional.
- A interpretação dos resultados deve ser feita dentro do contexto da história clínica do paciente, em relação com os dados clínicos e patológicos adicionais do paciente, por um patologista qualificado.
- É importante utilizar as quantidades indicadas dos componentes, para evitar comprometer o processo de reação.
- O descongelamento e congelamento repetido das amostras de DNA podem levar a um comprometimento da reação de detecção.

## 9. Substâncias que podem interferir

- Baixa eficiência de PCR devido à inibição da PCR na matéria-prima do DNA (por exemplo, sangue).
- Altas concentrações de EDTA em tampões de eluição podem levar a uma inibição da PCR. Use apenas as quantidades recomendadas de DNA.

## 10. Preparação de amostras

Amostras de tecido fixadas em formalina, impregnadas em parafina (FFPE), amostras de esfregaços/escovados cervicais, bem como amostras ThinPrep podem ser usadas como material de partida para a genotipagem de HPV.

### Kits recomendados para extração de DNA:

- Amostras FFPE: VisionArray FFPE DNA Extraction Kit (VI-0001).
- Amostras ThinPrep: VisionArray Cytology DNA Extraction Kit (VI-0002).

Após a extração, é necessária uma medição da concentração de DNA para verificar a qualidade e a quantidade do DNA. Cada amostra deve ter uma concentração de DNA de pelo menos 15 ng/ $\mu$ l com alto grau de pureza (260/280: ~1.8).

Evite contaminações de DNA durante o procedimento de extração. Ao usar um micrótomo, as seções de tecido devem ser colocadas num tubo de reação imediatamente após o corte. A lâmina do micrótomo deve ser trocada entre diferentes amostras de tecido. O mesmo se aplica para amostras de tecido fixadas já colocadas em lâminas de vidro. O raspador deve ser mudado entre diferentes amostras.

## 11. Tratamento de preparação do dispositivo

Como primeiro passo, determine a quantidade necessária de PCRs (n), que resulta da quantidade de amostras de DNA mais um controlo negativo (mistura de reação sem modelo de DNA).

### Esquema de pipetagem:

No.	Reagentes	1x (conc. final)	nx
1	<u>VisionArray HPV PreCise Master Mix</u>	15 $\mu$ l (1x)	
2	Amostra de DNA	2.5-5 $\mu$ l	
3	H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l	
	<b>Volume Total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	

- Fazer aliquotas de VisionArray HPV PreCise Master Mix em frascos de PCR livre-de-DNA.
- Pipete o DNA da amostra para a mistura principal (nº 2 no esquema de pipetagem). Para o controlo negativo, adicionar 10 $\mu$ l de água livre de ADN/DNase.
- Se necessário, adicione água para atingir o volume final de reação de 25 $\mu$ l (nº 3 no esquema de pipetagem).
- Transfira as amostras para um termociclador pré-aquecido e calibrado.

## 12. Procedimento do teste

O protocolo de amplificação descrito neste manual foi estabelecido em frascos de PCR de 0,2 ml, utilizando as enzimas recomendadas, num sistema termociclador Biometra TProfessional. Se necessário, podem ser realizadas modificações, quando são usados outros termocicladores, de acordo com o fabricante. Desta forma, este protocolo deve ser testado quanto à compatibilidade antes da utilização. O termociclador usado deve ser calibrado de acordo com as diretrizes do fabricante.

### Perfil térmico:

Tempo	Temperatura	Repetições	Passo
10 min	25°C	x1	Incubação Uracil-DNA Glicosilase
10 min	95°C	x1	Ativação da HotStart Taq Polimerase, Desativação da Uracil-DNA Glicosilase
20 s	95°C	x10	Desnaturação
30 s	55°C		Hibridação
80 s	60°C		Extensão
20 s	95°C	x35	Desnaturação
30 s	38°C		Hibridação
80 s	60°C		Extensão
1 min	95°C	x1	Desnaturação
$\infty$	8°C	x1	

Tempo de rampa:  $\Delta$  5°C/s

O perfil térmico é otimizado para os reagentes recomendados neste manual. Mudanças na composição química ou na configuração devem ser validadas pelo utilizador antes do procedimento. Uma vez que a PCR tenha terminado, o frasco de reação deve ser armazenado a -16°C ... -22°C.

## 13. Interpretação dos resultados

O VisionArray HPV PreCise Master Mix destina-se a ser utilizado com o VisionArray HPV Chip e o VisionArray HPV Detection Kit. A interpretação dos resultados deve ser efetuada como o auxílio do respetivo VisionArray Analysis Package.

## 14. Procedimentos do controlo de qualidade recomendados

Para monitorizar o desempenho correto das amostras processadas e dos reagentes de teste, cada ensaio deve ser acompanhado de amostras de controlo positivas e negativas, validadas externamente. Se os controlos internos e/ou externos não demonstrarem a coloração apropriada, os resultados com amostras de pacientes devem ser considerados inválidos.

O controlo da PCR e amplificadas, pode ser realizado posteriormente por separação em eletroforese em gel de agarose. O comprimento do fragmento dos tipos de HPV é de cerca de 140pb e está presente apenas numa amostra positiva de HPV. O controlo positivo mostra uma faixa de 227pb.

Devido à baixa temperatura de hibridação e condições de PCR que favorecem os produtos de cadeia simples, não estão presentes em todos os testes, bandas claramente definidas. No entanto, ainda é possível uma hibridação de chips bem-sucedida. Apenas a ausência completa de uma banda no gel indica uma falha na PCR. Veja a seção de resolução de problemas para mais detalhes.

## 15. Características de desempenho

O desempenho do VisionArray HPV PreCise Master Mix foi testado no Sistema VisionArray contra uma mistura de PCR recém-preparada que compreende o VisionArray HPV Primer Kit 2.0 (VP-0001), VisionArray PreCise Taq DNA Polymerase (VE-0001), e VisionArray Uracil-DNA Glycosylase (VE-0002). A concordância entre os dois ensaios foi determinada como sendo de 100%. Portanto, consulte as características de desempenho do respetivo VisionArray HPV Chip.

## 16. Eliminação

A eliminação de reagentes deve ser realizada de acordo com as normas locais.

## 17. Resolução de problemas

Qualquer desvio relativamente às instruções de utilização pode comprometer reação de deteção das sequências alvo.

Problema	Causa possível	Ação
Ausência ou escassez de produto de amplificação	Reagentes de PCR fora da validade ou degenerados; perfil térmico incorreto.	Verificar os reagentes de PCR e o programa do termociclador.
	DNA padrão degradado; Produto reduzido de DNA.	Armazenar o DNA a -16...-20°C; evitar descongelamento e congelamento repetidos; usar o protocolo de extração alternativa.
	Inibidores da PCR na mistura de reação.	Utilizar protocolos de extração alternativos.
PCR amplifica o controlo negativo	Contaminação dos reagentes durante a preparação da amostra ou na configuração da PCR.	Usar reagentes recentes; evitar a contaminação da amostra.

## 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.
- Snijders P. J. F., et al. (1990) *Journal of General Virology* **71**:173-181.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



42 life sciences GmbH & Co. KG  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Alemanha  
Telefone: +49 471 4832-500  
Fax: +49 471 4832-308  
[www.42ls.com](http://www.42ls.com)  
E-mail: [info@42ls.com](mailto:info@42ls.com)

**Distribuído por:**  
ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Alemanha  
Telefone: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
E-mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

### Marcas registadas:

VisionArray® é uma marca registada da  
42 life sciences GmbH & Co. KG