



VisionArray HPV Chip 1.0

REF	VA-0001-10	Σ	10 testes
REF	VA-0001-50	Σ	50 testes

Para a detecção específica de 41 tipos de vírus do papiloma humano (HPV) que foram produzidos utilizando o VisionArray HPV Primer Kit 2.0.



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

1. Utilização pretendida

O VisionArray HPV Chip 1.0 destina-se a ser utilizado com o VisionArray Analysis Package para a deteção qualitativa e genotipagem de amplificações por PCR de 41 genótipos do Vírus do Papiloma Humano (HPV), clinicamente relevantes que foram produzidos utilizando o VisionArray HPV Primer Kit 2.0 ou o VisionArray HPV PreCise Master Mix.

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

As infeções com HPV são comuns e um principal fator de risco para o desenvolvimento de cancro do colo do útero. Atualmente, existem mais de 150 tipos diferentes de HPV descritos. Dependendo do risco de induzir o cancro, eles são divididos em tipos de Baixo Risco (BR), provável alto risco e Alto Risco (AR).

O VisionArray HPV Chip 1.0 está concebido para detetar os seguintes 41 genótipos:

Classificação dos 41 genótipos de HPV no VisionArray HPV Chip 1.0

Alto Risco	Provável Alto Risco	Baix Risco
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	26, 34, 53, 66, 67, 68a, 68b, 69, 70, 73, 82IS39, 82MM4	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 72, 81CP8304, 83MM7, 84MM8, 90, 91

Os tipos de HPV foram classificados de acordo com a atual literatura científica.

3. Princípio de teste

Os fragmentos de DNA com uma sequência específica são detetados a partir de um conjunto de fragmentos de DNA num chip de vidro, com a ajuda de sequências de DNA de captura imobilizadas, por hibridação-DNA/DNA. Para este sistema de deteção, podem ser usadas como matéria-prima, amostras de DNA de tecidos ou células fixadas em

formol e impregnadas em parafina. Como primeiro passo, as sequências alvo nestas amostras têm que ser amplificadas e biotiniladas em PCR. A hibridação entre as sequências amplificadas e as cadeias de ADN complementares é realizada subsequentemente. Após a hibridização, o DNA não ligado especificamente é removido por curtas etapas de lavagem de estrigência. As sequências biotiniladas ligadas especificamente são marcadas secundariamente com um conjugado de estreptavidina-peroxidase e visualizadas por uma coloração com tetrametilbenzidina (TMB).

4. Reagentes fornecidos

Estão incluídos os seguintes componentes:

Código	Componentes	Quantidade	
		10	50
VA-0001	VisionArray HPV Chip 1.0	10	5x10
	Instruções de utilização	1	1

Descrição do Chip:

Posicionamento das sequências de captura no chip:

GD		+	6	11	16	18	26		GD
		31	33	34	35	39	40		
42	43	44	45	51	52	53	54	55	56
57	58	59	61	62	66	67	68a	68b	69
70	72	73	81	82 IS39	82 MM4	83	84	90	91
35	34	33	31	26	18	16	11	6	+
54	53	52	51	45	44	43	42	40	39
68a	67	66	62	61	59	58	57	56	55
		81	73	72	70	69	68b		
GD		91	90	84	83	82 MM4	82 IS39		

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

* O HPV 55 é agora classificado como um subtipo de HPV 44, mas ainda é rotulado como HPV 55 por razões de consistência.

5. Materiais necessários mas não fornecidos

- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) ou VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)
- VisionArray HPV Primer Kit 2.0 (VP-0001) ou VisionArray HPV PreCise Master Mix (ES-0007)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

O VisionArray Analysis Package deve conter um VisionArray HPV Chip File 1.0 (E-4201) para uma correta digitalização.

6. Armazenamento e manuseamento

Os chips devem ser armazenados na sua embalagem original a -16 ... -22 ° C . Se estas condições de armazenamento forem seguidas, os chips são estáveis, sem perda de desempenho, pelo menos até à data de validade impressa no rótulo.

Depois de abrir a embalagem original, armazenar a -16... -22 ° C e utilizar os chips dentro de dois meses.

7. Avisos e precauções

- Ler as instruções antes de utilizar!
- Não utilizar os chips após terminar a data de validade
- Os chips devem ser usados num ambiente livre de pó. Evite a contaminação da superfície do chip com pó ou outras partículas!
- Evite contato direto com o campo da matriz na superfície do chip!
- Somente o lado marcado da lâmina pode ser usado para hibridização.
- Evite a contaminação cruzada de amostras, pois isso pode levar a resultados incorretos.

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
- O chip deve ser usado apenas para detetar os tipos de HPV descritos em 2. "Relevância clínica".

Além disso, os seguintes fatores podem influenciar o sistema de detecção:

- Desvio ao protocolo de detecção proposto (por exemplo, temperatura ou volumes dos reagentes).
- Material de DNA degradado ou pouco concentrado.
- Matéria-prima inadequada.
- Uso de equipamento não calibrado ou danificado.
- Em infeções fortes por HPV ou em caso de infeções múltiplas, a intensidade do controlo positivo de PCR pode ser prejudicada.
- Não trabalhe sob fluxo laminar durante o procedimento de ensaio, pois isso pode levar a uma diminuição dos resultados.

9. Substâncias que podem interferir

- Baixa eficiência de PCR devido a inibidores de PCR na matéria-prima do DNA (por exemplo, sangue).
- Uso de aditivos de PCR que podem influenciar a hibridização (por exemplo, DMSO, betaína, ureia).

10. Preparação de amostras

O material inicial para este sistema de detecção são produtos de amplificação por PCR que foram produzidos com o VisionArray HPV Primer Kit 2.0 ou o VisionArray HPV PreCise Master Mix.

A hibridização e detecção dos chips devem ser realizadas com o respetivo VisionArray Detection Kit, de acordo com as instruções de uso.

11. Tratamento de preparação do dispositivo

Colocar os chips à temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar.

12. Procedimento do teste

Efetuar a digitalização de acordo com as instruções de utilização do VisionArray Analysis Package.

13. Interpretação dos resultados

Com o auxílio do VisionArray HPV Chip 1.0, é possível fazer uma confirmação qualitativa sobre a presença ou ausência de um ou mais dos 41 tipos de HPV na amostra avaliada.

A intensidade dos sinais é influenciada pela prevalência das sequências-alvo na amostra, bem como de diversos fatores do sistema de detecção. Os números absolutos da intensidade do sinal não podem ser usados para quantificação da concentração de DNA.

Avaliação baseada em software

A avaliação automática dos resultados é realizada pelo respetivo VisionArray Analyzer Software. Um manual detalhado para a análise do chip está incluído no Software.

14. Procedimentos do controlo da qualidade recomendados

Controlos internos:

- Pontos-Guia (Guide dots)/Controlo de hibridização (GD): Esses pontos são utilizados pelo respetivo VisionArray Analyzer Software para o posicionamento da grelha. Além disso, a coloração dos pontos-guia é a prova de uma reação de hibridização, marcação e coloração bem-sucedida e é usada para o cálculo da intensidade relativa dos sinais.
- Controlo positivo/controlo-PCR (+): Estes controlos são utilizados para a avaliação da reação de PCR e a qualidade do modelo de PCR.
- Todas as sequências de captura e o controlo positivo estão configurados no chip em duplicado e os pontos-guia em triplicado. Os sinais são visíveis no chip como sinais de hibridização circulares.

Controlos externos:

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

15. Características de desempenho

15.1 Desempenho analítico:

A especificidade analítica e a sensibilidade do VisionArray HPV Chip 1.0 foram testadas para cada um dos 41 tipos de HPV separadamente. Para este propósito, testaram-se plasmídeos de sequência verificada com uma concentração de 50-500.000 equivalentes do genoma (GEQ).

Especificidade e limite de detecção para todos os 41 tipos de HPV

Tipo de HPV	Especificidade [%]	Limite de Detecção (GEQ)
6	100	50
11	100	50
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
40	99.2	50
42	100	500
43	100	500
44	100	500
45 (HR)	100	50
51 (HR)	100	50
52 (HR)	100	500
53	100	500
54	100	50
55	100	5,000
56 (HR)	100	50
57	100	500
58 (HR)	100	500
59 (HR)	100	5,000
61	100	500
62	100	500
66	100	500
67	100	50
68a	100	5,000
68b	97.6	500
69	100	500
70	100	50
72	100	5,000
73	100	5,000
81CP8304	98.4	50
82IS39	100	50
82MM4	100	500
83MM7	100	500
84MM8	100	5,000
90	100	500
91	100	500

A sensibilidade depende da quantidade e eficiência dos ciclos de PCR e da afinidade dos recetores.

A sensibilidade determinada refere-se à detecção de uma única sequência alvo. A detecção de uma infeção múltipla pode levar ao comprometimento da sensibilidade de alguns tipos de HPV, devido à

competição durante a reação de PCR, especialmente em amostras mistas com uma acentuada diferença de concentração.

O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nestas instruções de uso. Modificações nesses procedimentos podem alterar o desempenho e precisam ser validadas pelo utilizador.

15.2 Hibridação cruzada:

- Quando presente em altas concentrações, o HPV 70 hibridizou com o HPV 40 em 33% dos casos. No entanto, em concentrações mais baixas, não se observou hibridação cruzada.
- Quando presente em altas concentrações, o HPV 62 hibridizou com o HPV 81 em 66% dos casos. No entanto, em concentrações mais baixas, não se observou hibridação cruzada.
- Quando presente em altas concentrações, o HPV 68a hibridizou com o HPV 68b em 50% dos casos. Em concentrações mais baixas, não foi observada nenhuma hibridação cruzada. No entanto, o HPV 68b é um subtipo e, portanto, em altas concentrações não distinguíveis do HPV 68a.

15.3 Limite

Para a avaliação dos resultados, o tamanho dos pontos é definido para 50.

O limite (cutoff) foi definido para 25 na imagem em escala de cinza desse tamanho de ponto. Um sinal abaixo deste valor é considerado fundo pelo respetivo VisonArray Analyzer Software.

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 de sinal	Temperatura incorreta	Verificar temperatura de hibridação
	Reagentes fora da validade	Verificar os reagentes
Apenas pontos-guia e nenhum outro sinal	Problemas com o produto de PCR (PCR não suficientemente eficiente ou DNA padrão degradado)	Verificar a eficiência da PCR com um controlo positivo; Verificar os produtos químicos de PCR e o programa do termociclador; Verificar o produto de PCR em gel de agarose
	Matéria-prima incorreta	Verificar matéria-prima
	Combinação errada de chip e amostra	Verificar a combinação amostra/chip
Apenas pontos-guia e controlo de PCR, mas nenhum outro sinal	Nenhuma sequência alvo presente	Utilizar controlo positivo
Apenas pontos-guia e sinais HPV, mas nenhum controlo positivo	Alta Infeção por HPV ou infeção múltipla por HPV	Diluir amostra de DNA
	Amostra degradada	Nova extração de DNA; armazenar a -16...-22°C
Demasiado fundo	Tempo de incubação excessivo da Detection Solution ou Blue Spot Solution; temperatura de incubação muito alta	Verificar tempo e temperatura de incubação da Detection Solution e Blue Spot Solution
	Lâminas não secas devidamente	Verificar passo de secagem
Sinais fortes e fora dos limites	Tempo de incubação excessivo da Detection Solution ou Blue Spot Solution; temperatura de incubação muito alta	Ajuste gradual dos tempos e temperatura de incubação da Detection Solution e Blue Spot Solution

Problema	Causa possível	Ação
Sinais fracos	Temperatura de hibridação incorreta	Verificar temperatura
	Tempo de hibridação demasiado curto	Aumentar tempo de hibridação para um máximo de 30 min
	Tempo de incubação demasiado baixo da Detection Solution ou Blue Spot Solution Incubation	Aumentar tempo de incubação da Detection Solution e Blue Spot Solution
	Amplificação fraca por PCR / má qualidade do DNA padrão	Verificar DNA padrão
Sinais de hibridação cruzada e sinais falsos positivos	Contaminação dos reagentes-PCR ou do produto PCR	Substituir os reagentes-PCR em uso
	Contaminação durante a preparação da PCR ou do mistura de hibridização	Evitar a transferência de amostra durante a preparação da mistura
	Temperatura de hibridização muito baixa	Verificar temperatura de hibridação
	Vários chips incubados por muito tempo no mesmo tampão de lavagem	Execução rápida das etapas de lavagem
Sinal único em vez de duplicados	Eliminação mecânica do segundo sinal, p.e. devido ao contato com a ponta da pipeta	Evitar contato direto com o campo da matriz
	Cobertura irregular do campo da matriz devido a bolhas de ar	Aplicar soluções sem bolhas de ar
	Sinais fracos próximos do limite (1 acima e 1 abaixo)	Repetir PCR e deteção sob consideração das condições referidas no manual

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.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte helptech@zytovision.com



42 life sciences GmbH & Co. KG
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telephone: +49 471 4832-500
Fax: +49 471 4832-308
www.42ls.com
E-mail: info@42ls.com

Distributed by:

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telephone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Marcas registadas:

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