




## VisionArray Detection Kit

REF VK-0003-50  50 testes

Para deteção qualitativa de sequências de DNA em  
Chips VisionArray.



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

### 1. Utilização pretendida

O VisionArray Detection Kit foi desenvolvido para ser usado com o VisionArray PreCise Master Mix e o correspondente VisionArray DNA Chip para deteção qualitativa de sequências de DNA. A análise automática 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

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. Primeiro, as sequências alvo nestas amostras têm que ser amplificadas via PCR e simultaneamente marcadas com moléculas de biotina. Subsequentemente, as sequências amplificadas hibridizam com as cadeias de DNA complementares do chip na lâmina de vidro. Após a hibridização, o DNA não ligado especificamente é removido por curtas etapas de lavagem de estringência. 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

Os seguintes componentes estão incluídos:

Código	Componentes	Quantidade	Recipiente
HY-0001-1	Hybridization Solution	1 ml	Tubo de reação, tampa vermelha
WB-0012-250	100x Wash Buffer	250 ml	Frasco c/ tampa rosca (grande)
AB-0016-5	Detection Solution	5 ml	Frasco c/ tampa rosca (pequeno)
SB-0009-5	Blue Spot Solution	5 ml	Frasco c/ tampa rosca (pequeno), castanho
	Instruções de Utilização	1	

A Hybridization Solution, Detection Solution, e Blue Spot Solution são suficientes para 50 reações. O 100x Wash Buffer é suficiente para 50 testes com 6 tintas de coloração 70 ml cada.

### 5. Materiais necessários mas não fornecidos

#### Reagentes:

- Produto de PCR obtido com VisionArray PreCise Master Mix
- Água destilada ou desionizada

#### Equipamentos:

- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) ou VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)
- VisionArray DNA Chips
- Hibridador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Centrífuga de lâminas
- Tinas de coloração, 50-80 ml
- Pipetas

*Nota: O VisionArray Analysis Package deve conter o correspondente VisionArray Chip para uma correta digitalização.*

### 6. Armazenamento e manuseamento

Os componentes do kit devem ser armazenados a 2...8°C na posição vertical. Armazenar a Blue Spot Solution protegida da luz. Se estas condições de armazenamento forem seguidas, o kit funcionará, sem perda de desempenho, pelo menos até à data de validade impressa no rótulo.

### 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.
- Alguns dos componentes do kit contêm substâncias (em baixas concentrações e volumes) que são prejudiciais à saúde. Evite qualquer contacto direto com os reagentes. Tome as medidas de proteção adequadas (utilize luvas descartáveis, óculos de proteção e roupas de laboratório)!
- Se os reagentes entrarem em contacto com a pele, lave imediatamente a pele com grandes quantidades de água.
- Nunca pipetar soluções com a boca!
- Está disponível a ficha de dados de segurança, se solicitada, para utilização profissional.

### 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.
- Os componentes do kit estão otimizados para utilização conjunta e a substituição de um ou mais componentes pode levar a erros de desempenho.
- 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.
- 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 hibridação (por exemplo, DMSO, betaína, ureia).

## 10. Preparação de amostras

O material inicial para este sistema de detecção são sequências de DNA que foram amplificadas e biotinizadas com a VisionArray PreCise Master Mix.

## 11. Tratamento de preparação do dispositivo

- Preparação de 1x Wash Buffer: Diluir 1 parte 100x Wash Buffer em 99 partes de água destilada ou desionizada (num recipiente fechado o 1x Wash Buffer diluído é estável um mês à TA (18...22°C)).
- Colocar Hybridization Solution, Detection Solution, Blue Spot Solution, e 1x Wash Buffer à TA (18...22°C). Possíveis precipitados na Hybridization Solution podem ser eliminados por breve aquecimento (max. 37°C).
- Aquecer o hibridador ou estufa de hibridação a 42°C antes de utilizar.

## 12. Procedimento do teste

- 1 Remover a tampa protetora dos quadros azuis do campo da matriz.
- 2 Preparação da mistura de hibridização:
  - 20 µl Hybridization Solution
  - + 10 µl produto PCR
  - 30 µl mistura de hibridação (suficiente para um chip)

Homogeneizar bem a mistura de hibridização pipetando para cima e para baixo.
- 3 Pipetar 30 µl da mistura de hibridização cuidadosamente no lado esquerdo do campo da matriz (com etiqueta à direita) evitando bolhas de ar. Cubra todo o campo da matriz cobrindo cuidadosamente o campo da matriz, da esquerda para a direita, com a tampa de plástico fornecida.
- 4 Transferir o chip rapidamente para o hibridador pré-aquecido ou câmara húmida em estufa de hibridação e incubar 30 min a 42°C (+/- 1°C).

*Nota: Este passo deve ser feito para cada array um após o outro, nunca em paralelo. Desvios de mais de 1 ° C devem ser evitados. É aconselhada a utilização de um termómetro calibrado.*

- 5 Preparar entretanto 3 tinas de coloração com 1x Wash Buffer.
- 6 Terminado o tempo de incubação, retirar o chip da incubadora e retirar a tampa cuidadosamente. Drenar a mistura de hibridização cuidadosamente num toalhete de papel e lavar a lâmina imediatamente em 1x Wash Buffer. De seguida, agitar suavemente a lâmina 3 vezes bidirecionalmente no primeiro frasco de coloração. Repita este procedimento de lavagem no 2º frasco de coloração. Depois, transferir o chip para o terceiro frasco, agitar 3 vezes e incubar por 1 min.

*Nota: Não utilizar mais de 6 lâminas por tina de coloração. As lâminas não manipuladas devem permanecer na temperatura de hibridização. A exposição à temperatura ambiente deve ser a mais curta possível.*

- 7 Retirar o chip da tina de coloração, escorrer rapidamente sobre um toalhete de papel e secar na centrífuga de lâminas por 15-30 s.

*Nota: A utilização de uma centrífuga de lâminas é absolutamente obrigatório para evitar gotículas deixadas na matriz.*

- 8 Pipetar 100 µl de Detection Solution cuidadosamente no campo da matriz seco sem tocar na superfície. O campo da matriz deve ser coberto uniformemente e as bolhas de ar devem ser removidas.
- 9 Incubar 10 min numa superfície lisa à TA (18...22°C).
- 10 Entretanto, preparar 3 tinas de coloração com 1x Wash Buffer.
- 11 Após a incubação, lavar e secar como descrito nos passos 6 e 7. Manter a tina de coloração que foi usada em último lugar para o passo 13.
- 12 Aplicar 100 µl de Blue Spot Solution cuidadosamente na totalidade da matriz e incubar por 5 min à TA (18...22°C). O surgimento da cor pode ser observado por inspeção visual. No caso de uma coloração rápida e intensa, a incubação pode ser interrompida precocemente.

*Note: A Blue Spot Solution deve ser armazenada e incubada no escuro.*

- 13 Lavar a Blue Spot Solution no chip, em 1x Wash Buffer da tina de coloração do passo 10, durante aproximadamente 15 sec.
- 14 Secar brevemente o chip num toalhete de papel e secar na centrífuga de lâminas durante 30 s.

Os chips podem agora ser analisados com o VisionArray Analysis Package.

## 13. Interpretação dos resultados

### 13.1 Nota Geral

Com o auxílio do VisionArray DNA Chip, é possível fazer uma confirmação qualitativa sobre a presença ou ausência de sequências de DNA específicas. 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.

### 13.2 Avaliação

Depois de seguir este protocolo, o chip pode ser avaliado. Sinais positivos são visíveis na lâmina como áreas circulares azuis escuras. A avaliação automatizada do chip é realizada com o respetivo VisionArray Analyzer Software.

### 13.3 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

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

Consulte as instruções de utilização do respetivo VisionArray DNA 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 a reação de detecção 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 específicos, mas nenhum controlo positivo	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
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 hibridização
	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

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  
Telephone: +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)

**Distributed by:**

ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Alemanha  
Telephone: +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