Vision*Array*
Detection Kit

REF VK-0003-50 Σ 50 testes

Para deteção qualitativa de sequências de DNA em Chips Vision*Array*

4250380M008PY

CE IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

de acordo com o RIV (UE) 2017/746

1. Objectivo pretendido

O Vision*Array* Detection Kit foi desenvolvido para ser utilizado com um Vision*Array* PreCise Master Mix e o Vision*Array* DNA Chip correspondente para a detecção qualitativa de sequências de ADN específicas. A análise automatizada tem de ser efectuada com um Vision*Array* Software.

O produto destina-se apenas a utilização profissional. Todos os testes que utilizam o produto devem ser realizados num laboratório de anatomia patológica certificado e licenciado, sob a supervisão de um profissional qualificado.

2. Princípio do teste

Os fragmentos de ADN com uma sequência específica são detectados a partir de um conjunto de fragmentos de ADN num chip de vidro com a ajuda de sequências de captura de ADN imobilizadas por hibridação ADN/ADN. Para este sistema de detecção, podem ser utilizadas como matéria-prima amostras de ADN de amostras de células ou tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Numa primeira fase, as sequências alvo nestas amostras têm de ser amplificadas e biotiniladas por PCR. A hibridação entre as sequências amplificadas e as sequências complementares de captura de ADN é efectuada subsequentemente. Após a hibridação, o ADN ligado inespecificamente é lavado através de curtos passos de lavagem rigorosos. As sequências biotiniladas especificamente ligadas são depois marcadas secundariamente com um conjugado de estreptavidina-peroxidase e visualizadas por coloração com tetrametilbenzidina (TMB).

3. 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 tinas de coloração 70 ml cada.

4. Materiais necessários mas não fornecidos

Reagentes:

- Produto de PCR obtido com Vision*Array* PreCise Master Mix
- Água destilada ou desionizada

Equipamentos:

- Vision*Array* SingleScan Software (E-4301) ou Vision*Array* MultiScan Software (E-4302)
- Vision*Array* DNA Chips
- Hibridador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Centrífuga de lâminas
- Tinas de coloração, 50-80 ml
- Pipetas

5. Armazenamento e manuseamento

Os componentes do kit dever 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.

Voltar às condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Não utilizar os reagentes para além do prazo de validade indicado no rótulo. O produto é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo quando manuseado em conformidade.

6. Avisos e precauções

- Ler o manual de instruções antes da utilização!
- Não utilizar os produtos após o prazo de validade ter sido atingido!
- Verificar se a embalagem está intacta antes da utilização; não utilizar o produto se a embalagem estiver danificada.
- Comunicar qualquer incidente grave relacionado com o produto ao fabricante e à autoridade competente, de acordo com os regulamentos locais!
- Alguns dos componentes do kit contêm substâncias (em baixas concentrações e volumes) que são prejudiciais à saúde. Evite qualquer contato 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, lavar imediatamente a pele com água abundante!
- A ficha de dados de segurança está disponível a pedido para o utilizador profissional.
- Não reutilizar os produtos, excepto se a reutilização for explicitamente autorizada!
- Evitar a contaminação cruzada das amostras, uma vez que tal pode conduzir a resultados erróneos.
- Para evitar contaminações, é necessário separar as etapas de trabalho com e sem ADN numa sala, bem como utilizar bancadas limpas para a preparação da mistura principal da PCR.
- As aparas devem ser utilizadas num ambiente sem pó. Evitar a contaminação da superfície da pastilha com pó ou outras partículas!
- Evitar o contacto directo com o campo da matriz na superfície do chip!

- Apenas o lado marcado da lâmina pode ser utilizado para hibridação.

Indicações de perigo e de precaução para HY-0001:

O componente determinante para o perigo é a formamida.

Perigo

H351	Suspeito de provocar cancro.
H360FD	Pode afectar a fertilidade. Pode afectar o feto.
H373	Pode afectar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
P201	Obter instruções especiais antes da utilização.
P202	Não manusear até que todas as precauções de segurança tenham sido lidas e compreendidas.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/spray.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P308+P313	Em caso de exposição ou preocupação: Obter aconselhamento/atenção médica.
P405	Loja fechada.

Indicações de perigo e de precaução para AB-0016 e WB-0012:

O componente que determina o risco é a mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-um [EC no. 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-um [EC no. 220-239-6] (3:1).

Atenção

H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/ vapores/aerossóis.
P272	A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com água/…
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

7. Limitações

- Para utilização *em* diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para uso profissional.
- Apenas para utilização não automatizada.
- A interpretação dos resultados deve ser efectuada no contexto da história clínica do doente, no que diz respeito a dados clínicos e patológicos adicionais, 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 deteção.
- Não trabalhe sob fluxo laminar durante o procedimento de ensaio, pois isso pode levar a uma diminuição dos resultados.
- O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nas presentes instruções de utilização. As modificações a estes procedimentos podem alterar o desempenho e têm de ser validadas pelo utilizador. Este IVD só é certificado como CE quando utilizado de acordo com as instruções descritas neste manual para utilização no âmbito da utilização prevista.

8. Substâncias interferentes

- Baixa eficiência da PCR devido a inibidores da PCR na matéria-prima de ADN (por exemplo, sangue).
- Concentrações elevadas de EDTA nos tampões de eluição de ADN podem levar a uma inibição da PCR. Utilizar apenas as quantidades recomendadas de ADN.
- Utilização de aditivos de PCR que possam influenciar a hibridação (por exemplo, DMSO, betaína, ureia).

9. Preparação de amostras

O material inicial para este sistema de deteção são sequências de DNA que foram amplificadas e biotiniladas com a Vision*Array* PreCise Master Mix.

10. 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.

11. Procedimento de 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 2° 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 laminas 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, preparer 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 Vision*Array* Software.

12. Interpretação dos resultados

12.1 Nota Geral

Com o auxílio do Vision*Array* 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 deteção. Os números absolutos da intensidade do sinal não podem ser usados para quantificação da concentração de DNA.

12.2 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 Vision*Array* Software.

12.3 Avaliação baseada em software

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

13. Procedimentos de controlo de 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.

14. Características de desempenho

Consulte as instruções de utilização do respetivo Vision*Array* DNA Chip.

15. Eliminação

A eliminação dos reagentes deve ser efectuada de acordo com os regulamentos locais.

16. Resolução de problemas

Qualquer desvio das instruções de funcionamento pode prejudicar a reacção de detecção da sequência 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 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

17. Revisão

Revisão	Descrição da alteração
2.1.1	6. Avisos e precauções Nota adicional para o controlo da integridade da embalagem

www.zytovision.com

Consultar www.zytovision.com para obter as instruções de utilização mais recentes, bem como as instruções de utilização em diferentes línguas.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas perguntas.
Contactar helptech@zytovision.com

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telefone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Correio electrónico: info@zytovision.com

Marcas registadas:
ZytoVision® e Vision*Array*® são uma marca registada da ZytoVision GmbH.