




VisionArray HPV PreCise Master Mix

REF ES-0007-50  50 test

Per l'amplificazione di sequenze specifiche HPV



Dispositivo medico – diagnostico *in vitro*
in conformità alla Direttiva UE 98/79/EC

1. Scopo previsto

Il VisionArray HPV PreCise Master Mix viene utilizzato per amplificare e biotinilare sequenze specifiche della regione L1 del genoma del Papilloma Virus umano (HPV) tramite PCR (Polymerase Chain Reaction).

Il VisionArray HPV PreCise Master Mix è progettato per amplificare i diversi tipi di HPV, includendo, ma non limitandosi a quelli rilevati con i rispettivi VisionArray HPV Chips e le sequenze genomiche del gene umano HLA-DQA1, utilizzato come controllo positivo.

Il VisionArray HPV PreCise Master Mix deve essere utilizzato con il kit VisionArray Detection Kit e con il rispettivo VisionArray HPV Chips. L'analisi automatica deve essere effettuata con un VisionArray Analysis Package.

Questo prodotto è progettato per uso diagnostico *in vitro* (in conformità alla direttiva UE 98/79/CE). L'interpretazione dei dati deve essere condotta da un patologo qualificato, considerando il contesto della storia clinica del paziente, rispettando gli altri dati clinici e patologici del caso.

2. Rilevanza clinica

Fare riferimento alle istruzioni d'uso del singolo chip.

3. Principio del metodo

Utilizzando la PCR (Polymerase Chain Reaction), le sequenze di DNA possono essere amplificate selettivamente. Il principio su cui si basa la PCR consiste nel ripetersi di un ciclo da tre passaggi: denaturazione, annealing e prolungamento. La ripetizione di questi passaggi porta all'amplificazione esponenziale delle sequenze target.

Il primo passaggio di ciascun ciclo è la denaturazione, nel quale il riscaldamento della miscela di reazione porta alla separazione dei filamenti di DNA. Durante l'annealing, primer complementari si

legano alla singola catena di DNA. I primer fiancheggiano le sequenze target e fungono da punti di partenza per l'integrazione dei nucleotidi nella fase di prolungamento, creando copie identiche al DNA modello. I primer utilizzati in questo kit sono marcati con biotina. Di conseguenza, ciascun nuovo prodotto di PCR è automaticamente biotinilato per la successiva rivelazione.

Il VisionArray HPV PreCise Master Mix è una miglioria del Sistema GP5/GP6 (Snijders et al., 1990) ed è diretto verso il gene L1, una regione altamente conservata del genoma dell'HPV. A seconda del genotipo HPV, il risultato dell'amplificazione PCR corrisponde a frammenti di lunghezza pari a 139-148 bp.

I primer verso il gene umano HLA-DQA1 sono raccomandati come controllo positivo dall'OMS nei loro manuali di laboratorio sul Papilloma Virus umano e sono quindi anche inclusi nel VisionArray HPV PreCise Master Mix.

Per evitare la contaminazione con i prodotti di amplificazione della PCR, sono inclusi nel VisionArray HPV PreCise Master Mix anche nucleotidi uracile. Eseguendo un passaggio con Uracil-DNA-glicosidasi prima della PCR, è possibile rimuovere tutte le sequenze che contengono uracile e quindi possibili contaminazioni con prodotti di PCR precedenti. L'Uracil-DNA-glicosidasi è inattivata a temperature superiori ai 95°C, quindi la reazione di PCR può poi essere eseguita, come solito.

4. Reagenti forniti

Il kit VisionArray HPV PreCise Master Mix è costituito da:

- VisionArray HPV Primer Mix 2.0
- VisionArray PreCise Taq DNA Polimerasi
- VisionArray Uracil-DNA Glicosidasi
- H₂O
- MgCl₂
- PCR-Buffer
- Soluzione dNTP/dUTP

Il VisionArray HPV PreCise Master Mix è disponibile in un unico formato:

- ES-0007-50: 0.75 ml (50 reazioni da 15 µl ciascuna)

5. Materiali richiesti ma non forniti

Reagenti:

- H₂O (PCR-grade)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

Attrezzatura:

- Provette per PCR
- Termociclatore
- Pipette
- VisionArray HPV Chips (VA-0001; VA-0002)
- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) o VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)

Nota: I VisionArray Analysis Package devono contenere un VisionArray HPV Chip File per un buon risultato.

6. Conservazione e stoccaggio

Il VisionArray HPV PreCise Master Mix deve essere conservato a -16/-22°C in posizione verticale. Se vengono seguite queste condizioni di conservazione, il prodotto sarà performante, senza perdere le proprie caratteristiche, almeno fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

Ridurre al minimo i passaggi di congelamento-scongelo, fino a un massimo di 10 cicli, stoccando il prodotto in aliquote. Dopo l'apertura della provetta, utilizzare il prodotto entro 6 mesi.

I prodotti di PCR devono essere tenuti a temperatura ambiente per il più breve tempo possibile.

7. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni d'uso prima dell'utilizzo.
- Non utilizzare i reagenti una volta superata la data di scadenza.

- Evitare qualsiasi cross-contaminazione e contaminazione micro-batterica dei reagenti.
- Non dispensare mai le soluzioni con la bocca.
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per utilizzatori professionali.
- Per evitare la contaminazione è necessario separare i luoghi in cui vengono eseguiti i passaggi con e senza DNA e utilizzare piani di lavoro puliti per la preparazione del master mix di PCR.

8. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- L'interpretazione dei risultati deve essere condotta da un patologo qualificato, considerando il contesto della storia clinica del paziente, rispettando gli altri dati clinici e patologici.
- È importante utilizzare il quantitativo indicato di reagenti per evitare di danneggiare la reazione.
- Ripetuti scongelamenti e congelamenti dei campioni di DNA possono danneggiare la reazione di rivelazione.

9. Sostanze interferenti

- La PCR potrebbe avere una scarsa efficienza perché inibita da parte della materia prima del DNA (per esempio: sangue).
- Una concentrazione elevata di EDTA nei buffer di eluizione potrebbe comportare un'inibizione della PCR. Utilizzare solo il quantitativo raccomandato di DNA.

10. Preparazione dei campioni

Campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), campioni cervicali, sia strisci che in fase liquida (ThinPrep), possono essere utilizzati come materiale di partenza per la genotipizzazione dell'HPV.

Kit di estrazione DNA consigliati:

- Campioni FFPE: [VisionArray FFPE DNA Extraction Kit \(VI-0001\)](#).
- Campioni ThinPrep: [VisionArray Cytology DNA Extraction Kit \(VI-0002\)](#).

Dopo l'estrazione, è necessario misurare la concentrazione di DNA per controllarne la qualità e la quantità. Ciascun campione dovrebbe avere una concentrazione di DNA pari almeno a 15 ng/µl con un elevato grado di purezza (260/280: ~1.8).

Evitare di contaminare il DNA durante le procedure di estrazione. Quando si taglia al microtomo, le sezioni dovrebbero essere inserite immediatamente in una provetta di reazione subito dopo il taglio. La lama da microtomia dovrebbe essere cambiata tra un campione e l'altro. Utilizzare le stesse precauzioni per campioni di tessuto già montati su vetrino. Cambiare lo scraper dopo ciascun campione.

11. Trattamento preparatorio del prodotto

Come primo passaggio, definire la quantità di cicli di PCR (n) necessari, che risulta dalla quantità di DNA campione più un controllo negativo (miscela di reazione senza DNA template).

Schema di dispensazione:

No.	Reagenti	1x (conc. finale)	nx
1	VisionArray HPV PreCise Master Mix	15 µl (1x)	
2	Campione di DNA	2.5-5 µl	
3	H ₂ O	ad 25 µl	
	Volume Totale	25 µl	

- Aliquotare il [VisionArray HPV PreCise Master Mix](#) nelle provette per PCR DNA/DNasi free.
- Dispensare il campione di DNA nel Master Mix (No. 2 nello schema di dispensazione). Per il controllo negativo, aggiungere 10 µl di acqua DNA/DNasi free.
- Se necessario, aggiungere acqua per raggiungere il volume di reazione finale di 25 µl (No. 3 nello schema di dispensazione).
- Trasferire i campioni in un termociclatore preriscaldato e calibrato.

12. Procedura di lavoro

Il protocollo di amplificazione descritto in questa scheda è stato stabilito utilizzando vial da PCR da 0.2 ml utilizzando gli enzimi raccomandate su un termociclatore Biometra TProfessional Thermocycler System. Se necessario, possono essere apportate modifiche, in accordo con il produttore, se si utilizza un altro tipo di termociclatore. Deve essere testata la compatibilità di questo protocollo, prima dell'uso. Il termociclatore utilizzato deve essere calibrato in accordo alle linee guida definite dal produttore.

Profilo termico:

Tempo	Temperatura	Ripetizioni	Passaggio
10 min.	25°C	x1	Incubazione con Uracil-DNA Glicosidasi
10 min.	95°C	x1	Attivazione della HotStart Taq Polimerasi, Disattivazione della Uracil-DNA Glicosidasi
20 s	95°C	x10	Denaturazione
30 s	55°C		Annealing
80 s	60°C		Allungamento
20 s	95°C	x35	Denaturazione
30 s	38°C		Annealing
80 s	60°C		Allungamento
1 min.	95°C	x1	Denaturazione
∞	8°C	x1	

Velocità di incremento temperatura: Δ 5°C/s

Il profilo termico è ottimizzato per i reagenti raccomandati in questa scheda. Modifiche alla composizione chimica o di settaggio devono essere validate dall'utilizzatore prima dell'uso. Una volta che la PCR è terminata, la provetta di reazione va conservata a -16°C / -22°C.

13. Interpretazione dei risultati

Il [VisionArray HPV PreCise Master Mix](#) deve essere utilizzato con un [VisionArray HPV Chip](#) e il [VisionArray HPV Detection Kit](#). L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita con l'aiuto dei rispettivi [VisionArray Analysis Package](#).

14. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Per monitorare che i campioni processati e i reagenti mantengano le corrette performance, ogni test deve essere condotto associato a campioni di controllo esterni validati positivi e negativi. Se i campioni esterni e/o interni non si colorano correttamente, il risultato con il campione del paziente non deve essere ritenuto valido.

Il controllo della PCR e gli amplificati possono essere monitorati poi tramite separazione elettroforetica in gel d'agarosio. La lunghezza dei frammenti dei diversi tipi di HPV è di circa 140 bp ed è presente solo nei campioni HPV positivi. Il controllo positivo presenta una banda a 227 bp.

A causa della bassa temperature di annealing e delle condizioni di PCR che favoriscono i prodotti a singola catena, bande nette non sono presenti in ogni test. Ad ogni modo, è possibile che l'ibridazione abbia comunque avuto successo. Solo la completa assenza della banda nel gel indica che la PCR non ha avuto esito positivo. Vedere la sezione 17. Risoluzione dei problemi per ulteriori dettagli.

15. Caratteristiche di performance

La performance del VisionArray HPV PreCise Master Mix è stata testata sul sistema VisionArray System confrontandola con quella di un mix di PCR appena preparato costituito da VisionArray HPV Primer Kit 2.0 (VP-0001), VisionArray PreCise Taq DNA Polimerasi (VE-0001) e VisionArray Uracil-DNA Glicosidasi (VE-0002). I risultati dei due test devono concordare al 100%. In ogni caso, fare riferimento alle caratteristiche di performance di ciascun VisionArray HPV Chip.

16. Smaltimento

Smaltire i reagenti in accordo a quanto previsto dalle disposizioni locali vigenti.

17. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica alle istruzioni d'uso può comportare un risultato diverso nella rilevazione delle sequenze target.

Problema	Possibile causa	Azione
Prodotto di amplificazione mancante o scarso	Reagenti di PCR scaduti o deteriorati; programma del termociclatore errato.	Controllare i reagenti di PCR e il programma del termociclatore.
	Modello di DNA degradato; bassa resa di DNA.	Conservare il DNA a -16 / -20°C; evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti; utilizzare protocolli di estrazione alternativi.
	Inibitori di PCR nel mix di reazione.	Utilizzare protocolli di estrazione alternativi.
Amplificati di PCR nel controllo negativo	Contaminazione dei reagenti durante la preparazione del campione o durante l'impostazione della PCR.	Utilizzare reagenti nuovi; evitare la contaminazione dei campioni.

18. Letteratura

- 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.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande.

Contattare per cortesia helptech@zytovision.com



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

Distribuito da:

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

Marchi registrati:

VisionArray® è un marchio registrato di
42 life sciences GmbH & Co. KG