



BCL2 oligomix Alert kit pesquisa do DNA BCL2-IgH MBR e mcr

REF BANG08-02



ÍNDICE

USO PREVISTO	pág. 1
PRINCÍPIO DO TESTE	pág. 2
DESCRIÇÃO DO KIT	pág. 2
MATERIAL INCLUÍDO NO KIT	pág. 3
MATERIAL NECESSÁRIO NÃO INCLUÍDO NO KIT	pág. 4
OUTROS PRODUTOS REQUERIDO	pág. 4
ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES	pág. 4
AMOSTRAS E CONTROLOS	pág. 6
PROCEDIMENTO	pág. 7
LIMITES DO PROCEDIMENTO	pág. 13
CARACTERÍSTICAS DA PERFORMANCE	pág. 14
BIBLIOGRAFIA	pág. 15
PROBLEMAS E SOLUÇÕES	pág. 16
SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS	pág. 18

USO PREVISTO

O produto «BCL2 oligomix Alert kit» é um teste qualitativo de amplificação dos ácidos nucleicos para a **pesquisa do DNA do rearranjo BCL2-IgH, translocação t(14;18), variantes MBR e mcr** no DNA extraído de amostras de sangue periférico colhido em EDTA, sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio, e amostras de biopsias frescas e congeladas.

O produto é empregado, juntamente aos dados clínicos e a outros exames de laboratório, no diagnóstico e na monitorização da afeção mínima que persiste nos pacientes afectados por linfoma folicular ou linfoma de grandes células.

BCL2 oligomix Alert kit pesquisa do DNA BCL2-IgH MBR e mcr

REF

BANG08-02

PRINCÍPIO DO TESTE

O procedimento prevê a execução de três tipos de reacções de amplificação, MBR, mcr e ABL com um termóstato programável (thermal - cycler).

A reacção MBR prevê duas reacções sucessivas de amplificação (nested) específicas para o rearranjo BCL2-IgH, variante MBR (MBR).

A reacção mcr prevê duas reacções sucessivas de amplificação (nested) específicas para o rearranjo BCL2-IgH, variante mcr (mcr).

A reacção ABL prevê uma única reacção de amplificação (single round) específica para o gene ABL (ABL) que é utilizada como controlo de idoneidade da amostra.

No caso das reacções MBR e mcr uma primeira reacção de amplificação, específica para uma região do rearranjo BCL2-IgH, é realizada no primeiro tubo, partindo do DNA extraído das amostras em exame. Em seguida, uma segunda reacção de amplificação, específica para o rearranjo, é realizada no segundo tubo, partindo do produto da primeira reacção de amplificação.

A presença dos produtos específicos da segunda reacção de amplificação indica a presença do DNA do rearranjo BCL2-IgH na amostra de partida.

No caso da reacção ABL, a reacção de amplificação específica para uma região do gene ABL, é realizada no segundo tubo, partindo do produto da primeira reacção de amplificação.

A presença do produto específico de amplificação de controlo indica a presença do DNA do gene ABL na amostra de partida.

DESCRIÇÃO DO KIT

O kit fornece os seguintes componentes:

MBR OligoMIX e mcr OligoMIX de primeira amplificação

Misturas optimizadas de reagentes para a amplificação dos ácidos nucleicos em uma solução de estabilização, **pré-aliquotadas em tubos «monoteste» prontos para o uso**. Cada tubo contém 40 µL de solução e 50 µL de óleo de vaselina.

MBR OligoMIX é alíquotada em tubos «monoteste» AZUIS.

mcr OligoMIX é alíquotada em tubos «monoteste» NEUTROS.

As misturas de reagentes fornecem os oligonucleotídeos primers da primeira amplificação, o sistema tampão, o cloreto de magnésio e os nucleotídeos trifosfatos.

No caso de **MBR OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para as regiões genómicas **MBR e IgH**.

No caso de **mcr OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para as regiões genómicas **mcr e IgH**.

MBR OligoMIX e mcr OligoMIX de segunda amplificação

Misturas optimizadas de reagentes para a amplificação dos ácidos nucleicos em uma solução de estabilização, **pré-aliquotadas em tubos «monoteste» prontos para o uso**. Cada tubo contém 44 µL de solução e 50 µL de óleo de vaselina.

MBR OligoMIX é alíquotada em tubos «monoteste» VERMELHOS.

mcr OligoMIX é alíquotada em tubos «monoteste» VERDES.

As misturas de reagentes fornecem os oligonucleotídeos primers da segunda amplificação, o sistema tampão, o cloreto de magnésio e os nucleotídeos trifosfatos.

No caso de **MBR OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para as regiões genómicas **MBR e IgH**.

No caso de **mcr OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para as regiões genómicas **mcr e IgH**.

ABL OligoMIX para a amplificação de controlo

Uma mistura otimizada de reagentes para a amplificação dos ácidos nucleicos em uma solução de estabilização, **pré-aliquotada em tubos «monoteste» AMARELOS prontos para o uso**. Cada tubo contém 40 µL de solução e 50 µL de óleo de vaselina.

A mistura de reagentes fornece os oligonucleotídeos primers da amplificação de controlo, o sistema tampão, o cloreto de magnésio e os nucleotídeos trifosfatos.

Os oligonucleotídeos primers são específicos para o gene **ABL**.

O kit permite efectuar **25 reacções**, controlos positivos e negativos incluídos.

MATERIAL INCLUÍDO NO KIT

Componente	Descrição	Quantidade	Composição	Etiquetagem
MBR OligoMIX de primeira amplificação	mistura de amplificação em tubos AZUIS de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotídeos externos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton x-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina	-
mcr OligoMIX de primeira amplificação	mistura de amplificação em tubos NEUTROS de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotídeos externos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton x-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina	-
ABL OligoMIX amplificação de controlo	mistura de amplificação em tubos AMARELOS de 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotídeos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton x-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina	-
MBR OligoMIX de segunda amplificação	mistura de amplificação em tubos VERMELHOS de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotídeos internos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton x-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina	-
mcr OligoMIX de segunda amplificação	mistura de amplificação em tubos VERDES de 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotídeos internos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton x-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina	-

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO INCLUÍDO NO KIT

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas sem pó descartável em látex ou similares.
- Microcentrífuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro para aerosol ou a deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Termóstato programável (thermal - cycler).

OUTROS PRODUTOS REQUERIDO

Os reagentes para a extracção do DNA das amostras a analisar, para o controlo positivo de amplificação e para a detecção do DNA amplificado **não** estão incluídos neste kit. Para realizar esta fase analítica aconselha-se a utilização dos seguintes produtos acessórios produzidos por ELITechGroup S.p.A.:

«**EXTRAcell**» (código EXTD02), kit de extracção do DNA das amostras celulares; o kit permite efectuar 50 extracções.

«**EXTRAffin**» (código EXTF01), kit de extracção de ácidos nucleicos de amostras de biopsias; o kit permite efectuar 50 extracções.

«**BCL2 - Positive Control**» (código CTRG08), controlo positivo de amplificação de DNA plasmídico; o kit fornece controlo para 25 sessões.

«**DNA polymerase 2 U / µL**» (código ER40 e ER140), enzima DNA polimerase termoestável para a amplificação dos ácidos nucleicos; o kit permite realizar 125 reacções.

«**ELECTROPHORESIS 3**» (código EPH03), detecção do DNA amplificado por electroforese em gel de agarose; o kit permite realizar 120 detecções.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este kit é reservado para uso exclusivo *in vitro*.

Advertências e precauções gerais

Manipular e eliminar todas as amostras biológicas como se podem transmitir agentes infecciosos. Evitar o contacto directo com as amostras biológicas. Evitar a produção de salpicos ou aerosol. O material que está em contacto com as amostras biológicas deve ser tratado com Hipoclorito de sódio a 3% pelo menos por 30 minutos ou ainda tratado em autoclave a 121° C durante uma hora antes de ser eliminado.

Manipular e eliminar todos os reagentes e todos os materiais usados para efectuar o teste como se podem transmitir agentes infecciosos. Evitar o contacto directo com os reagentes. Evitar a produção de salpicos ou aerosol. Os resíduos devem ser tratados e eliminados segundo as regras adequadas de segurança. O material descartável combustível deve ser incinerado. Os resíduos líquidos que contém ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Usar roupas de protecção, luvas adequadas e proteger os olhos ou o rosto.
Não pipetar nenhuma solução com a boca .
Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na área de trabalho.
Lavar bem as mãos depois de haver manipulado as amostras e os reagentes.
Eliminar os reagentes sobranes e os resíduos segundo as normas vigentes.
Ler todas as instruções fornecidas no kit antes de realizar o teste.
Respeitar às instruções fornecidas no kit durante a execução do teste.
Respeitar a data de validade do kit.
Utilizar somente os reagentes presentes no kit e aqueles aconselhados pelo fabricante.
Não intercambiar reagentes procedentes de diferentes lotes.
Não utilizar reagentes procedentes de kits de outros fabricantes.

Advertências e precauções para a biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extracção, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal instruído para evitar o risco de resultados incorrectos, em particular por causa da degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou da contaminação das amostras por parte de produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extracção / preparação das reacções de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação. Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extracção / preparação das reacções de amplificação.

É necessário dispor de batas, luvas e instrumentos destinados para a extracção / preparação das reacções de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação. Nunca transferir batas, luvas e instrumentos da área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação à área de extracção / preparação das reacções de amplificação.

As amostras devem ser destinadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas debaixo de uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contenham amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou usar pontas com filtro para aerosol. As pontas utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNase e RNase, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados debaixo de uma câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a serem utilizados em uma única sessão. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente para este uso. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo ou usar pontas com filtro para aerosol. As pontas utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNase e RNase, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para este uso.

Advertências e precauções específicas para os componentes

Os tubos que contenham os **OligoMIX** para a **primeira amplificação**, para a **segunda amplificação** e para a **amplificação de controlo** são descartáveis e portanto devem ser utilizados uma única vez em reacções de amplificação.

Os **OligoMIX** para a **primeira amplificação**, para a **segunda amplificação** e para a **amplificação de controlo** apresentam os seguintes conselhos de prudência (S):

S 23-25. Não respirar gases/fumos/vapores/aerosol. Evitar o contacto com os olhos.

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com **DNA** extraído das seguintes amostras biológicas: sangue periférico colhido em EDTA, sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio e amostras de biopsias frescas e congeladas.

Sangue periférico colhido em EDTA e sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio.

O sangue periférico colhido em EDTA ou sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio destinado à extracção do DNA deve ser extraído segundo as indicações do laboratório, transportado a +2° / +8°C e conservado a +2° / +8°C por um máximo de três dias.

Não congelar o sangue periférico ou medular de modo a evitar a perda do DNA.

As instruções para a extracção do DNA estão contidas nos Manuais de instruções para o uso dos kits «**EXTRAcell**».

Amostras de biopsias frescas e congeladas

As amostras de biopsias frescas destinadas à extracção do DNA devem ser colhidas segundo as indicações do laboratório, transportadas a +2° / +8° C e conservadas a +2° / +8° C por um máximo de quatro horas ou conservadas congeladas a -20° C por um máximo de trinta dias ou ainda a -70° C por períodos mais longos.

Recomenda-se subdividir em fragmentos de cerca de 1 mm³ as amostras a conservar congeladas de modo a não submetê-las a ciclos de congelamento / descongelamento repetidos.

As instruções para a extracção do DNA estão contidas nos Manuais de instruções para o uso dos kits «**EXTRAffin**».

Substâncias interferentes

O DNA extraído da amostra de partida não deve conter heparina ou hemoglobina para evitar fenómenos de inibição e a aparição de frequentes resultados não válidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenómenos de inibição por parte dos medicamentos antibióticos, anti-virais, quimioterápicos ou imunossuppressores.

Controlos de amplificação

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação preparando uma reacção de controlo negativo e uma reacção de controlo positivo.

Para o controlo negativo utilizar água bidestilada estéril (não fornecida no kit) para acrescentar à reacção no lugar do DNA extraído da amostra.

Para o controlo positivo, utilizar o DNA obtido de uma amostra positiva já testada ou o «**BCL2 - Positive Control**».

Controlos de qualidade

É aconselhável confirmar o completo procedimento de análises de cada sessão, extracção e amplificação, utilizando uma amostra negativa e uma amostra positiva já testadas ou do material de referência calibrado.

PROCEDIMENTO

Programação do ciclo térmico

(Para realizar na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação)

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- verificar que o bloqueio térmico do termóstato programável (thermal - cycler) seja compatível com o formato dos **tubos «monoteste»** incluídos no kit (tubos de 0,2 mL);
- fazendo referência à documentação do equipamento, verificar a modalidade de controlo da temperatura que o thermal - cycler adopta para a execução do ciclo térmico;
- quando possível, seleccionar a modalidade de **controlo da temperatura directamente no bloco térmico** (por exemplo thermal - cycler Hybaid™ ou Eppendorf™);
- quando não for possível (por exemplo thermal - cycler GeneAmp PCR System da Applied Biosystems™), utilizar a modalidade de controlo da temperatura pré-definida;
- quando solicitado, programar no thermal - cycler o volume de reacção de **100 µL**;
- programar no thermal - cycler os parâmetros do ciclo térmico descritos nas tabelas seguintes.

Ciclo térmico da primeira amplificação		
Número de ciclos	Temperaturas	Tempos
1 ciclo	95° C	4 min.
35 ciclos	95° C	1 min.
	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

Ciclo térmico da segunda amplificação		
Número de ciclos	Temperaturas	Tempos
1 ciclo	95° C	2 min.
30 ciclos	95° C	1 min.
	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

Preparação da primeira amplificação

(Para realizar na área de extracção / preparação da reacção de amplificação)

Cada amostra requer o uso de um tubo. O kit permite efectuar 25 reacções, MBR, 25 reacções mcr, 25 reacções ABL, controlos positivos e negativos incluídos. O número mínimo de reacções para uma sessão é nove: Três reacções MBR (controlo positivo, controlo negativo e amostra em análise), três reacções mcr (idem como a primeira), três reacções ABL (idem como a primeira).

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- descongelar as amostras a ser analisadas, o «**BCL2 - Positive Control**», centrifugá-las por 5 segundos para levar ao fundo o conteúdo e mantê-las em gelo;
- descongelar um **tubo «monoteste» AZUL (MBR)** para qualquer das amostras a analisar, um para o controlo negativo e um para o controlo positivo, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador indelével e mantê-los em gelo.
- descongelar um **tubo «monoteste» NEUTRO (mcr)** para qualquer das amostras a analisar, um para o controlo negativo e um para o controlo positivo, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador indelével e mantê-los em gelo.
- descongelar um **tubo «monoteste» AMARELO (ABL)** para qualquer das amostras a analisar e um para o controlo negativo, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador indelével e mantê-los em gelo.

*Nota : Os **tubos «monoteste»** são do tipo "a parede sútil" e devem ser manipulados com atenção para a evitar a rotura. As centrifugações devem ser realizadas com os redutores apropriados quando seja necessário e segundo a modalidade estabelecida deste manual de instruções para o uso.

- tomar a «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugá-la por 5 segundos para levar ao fundo o conteúdo e mantê-la em gelo;
- diluir como descrito na tabela a seguir a enzima «**DNA pol. 2U / µL**» com água bidestilada estéril. Preparar um volume de enzima suficientemente diluído para todas as reacções **MBR, mcr, ABL** (controlos incluídos) mais uma, para uma margem de segurança. A enzima diluída **não** pode ser conservada.

Número de reacções	DNA pol. 2U / µL	Água	Volume total
4	2,0 µL	18,0 µL	20 µL
5	2,5 µL	22,5 µL	25 µL
6	3,0 µL	27,0 µL	30 µL
7	3,5 µL	31,5 µL	35 µL
8	4,0 µL	36,0 µL	40 µL
9	4,5 µL	40,5 µL	45 µL
10	5,0 µL	45,0 µL	50 µL
11	5,5 µL	49,5 µL	55 µL
12	6,0 µL	54,0 µL	60 µL
13	6,5 µL	58,5 µL	65 µL
14	7,0 µL	63,0 µL	70 µL
15	7,5 µL	67,5 µL	75 µL
16	8,0 µL	72,0 µL	80 µL
17	8,5 µL	76,5 µL	85 µL
18	9,0 µL	81,0 µL	90 µL
19	9,5 µL	85,5 µL	95 µL
20	10,0 µL	90,0 µL	100 µL
21	10,5 µL	94,5 µL	105 µL

1. Acrescentar a cada **tubo «monoteste» AZUL (MBR), NEUTRO (mcr) e AMARELO (ABL) 5 µL** de DNA polimerase termoestável diluída (1 U).
2. Acrescentar a cada **tubo «monoteste» AZUL, NEUTRO e AMARELO 5 µL** de DNA obtido. Proceder do mesmo modo com o controlo negativo e com o controlo positivo.
3. Transferir os **tubos «monoteste» AZUIS, NEUTROS e AMARELOS** no thermal - cycler na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação e iniciar o ciclo térmico da primeira amplificação.

Preparação da segunda amplificação

(Para realizar na área de extracção / preparação da reacção de amplificação)

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- tomar a «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugá-la por 5 segundos para levar ao fundo o conteúdo e mantê-la em gelo;
- descongelar tanto os **tubos «monoteste» VERMELHOS (MBR)** quanto os azuis, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador indelével e mantê-los em gelo.
- descongelar tanto os **tubos «monoteste» VERDES (mcr)** quanto os neutros, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador indelével e mantê-los em gelo.

*Nota : Os **tubos «monoteste»** são do tipo "a parede sútil" e devem ser manipulados com atenção para a evitar a rotura. As centrifugações devem ser realizadas com os redutores apropriados quando seja necessário e segundo a modalidade estabelecida deste manual de instruções para o uso.

- diluir como descrito na tabela anterior a enzima «DNA pol. 2U / µL» com água bidestilada estéril. Preparar um volume de enzima suficientemente diluído para todas as reações MBR e mcr previstas (controles incluídos) mais uma, para uma margem de segurança. A enzima diluída **não** pode ser conservada.

4. Acrescentar a cada tubo «monoteste» VERMELHO (MBR) e VERDE (mcr) 5 µL de DNA polimerase termoestável diluída (1 U).
5. Acrescentar a cada tubo «monoteste» VERMELHO (MBR) 1 µL de produto da primeira amplificação do correspondente tubo «monoteste» AZUL (MBR).
6. Acrescentar a cada tubo «monoteste» VERDE (mcr) 1 µL de produto da primeira amplificação do correspondente tubo «monoteste» NEUTRO (mcr).

Nota: O produto da primeira amplificação está em grau de contaminar os testes sucessivos. Recluir o produto da primeira amplificação residuo e trocar as luvas ao final desta fase do procedimento.

7. Transferir os tubos «monoteste» VERMELHOS e VERDES no termal - cycler na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação e iniciar o ciclo térmico da segunda amplificação.

Nota: O produto de reação pode ser conservado a -20° C por um período máximo de um mês.

Detecção do produto específico de amplificação

(Para realizar na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação)

O produto específico da segunda amplificação pode ser detectado e identificado por meio de separação electroforética, utilizando-se um gel de agarose com 4% de brometo de etídio 1 µg / mL em tampão TAE 1x (20 mM TRIS base, 20 mM TRIS acetato, 1 mM EDTA dissódico), como no produto «ELECTROPHORESIS 3».

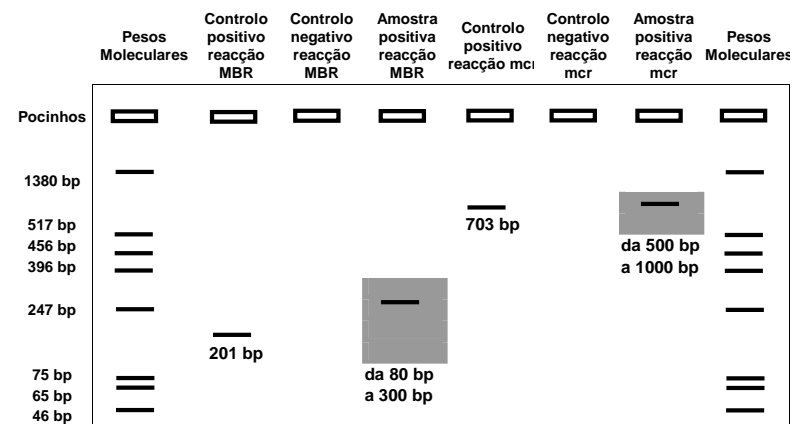
Os produtos específicos da segunda amplificação MBR tem dimensões: **de 80 a 300 bp**

Os produtos específicos da segunda amplificação mcr tem dimensões de: **da 500 a 1000 bp**

O produto específico da amplificação ABL tem dimensões de: **715 bp**

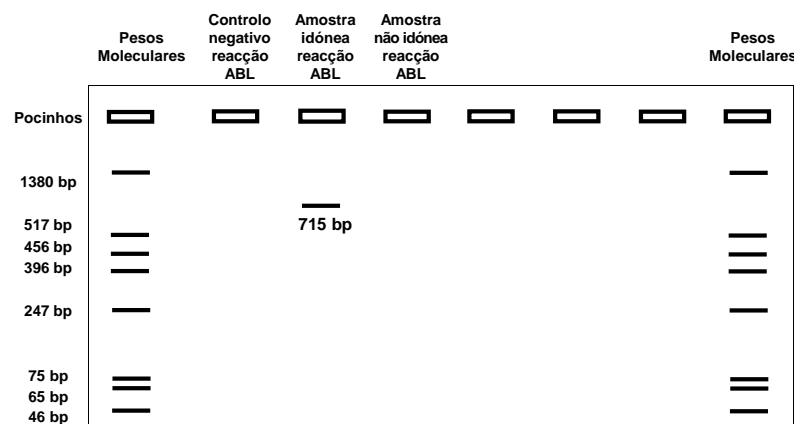
Nota: O produto da segunda amplificação pode contaminar os testes seguintes. Isolar o produto da segunda amplificação residuo e os descartes de produtos na fase de detecção.

A título de exemplo, está reproduzida a seguir uma ilustração esquemática que representa o resultado da separação electroforética dos produtos da segunda amplificação MBR e mcr.



Nota: Devido a uma homologia algumas vezes presente na região J do gene IgH, é possível observar, em associação ao produto específico da segunda amplificação MBR ou mcr, um ulterior produto de amplificação com dimensões superiores de aproximadamente 500 bp.

A título de exemplo, está reproduzida a seguir uma ilustração esquemática que representa o resultado da separação electroforética dos produtos da amplificação ABL.



É absolutamente necessário confirmar a identidade do produto da segunda amplificação de uma amostra, confrontando a sua migração no gel com a migração de um marker de peso molecular e com a migração do produto da segunda amplificação do controlo positivo.

A eventual presença de produtos não específicos de dimensões diferentes daquelas dos produtos específicos da segunda amplificação de uma amostra não tem nenhum significado em relação à pesquisa do dos rearranjos MBR e mcr e do gene ABL.

Interpretação dos resultados

Os resultados das reacções de controlo negativo e de controlo positivo são utilizados para confirmar a sessão de amplificação como descrito nas tabelas seguintes :

Amplificação dos controlos negativos	Amplificação
Produto específico MBR, mcr e ABL	
AUSENTE	CORRECTA
Amplificação dos controlos positivos	Amplificação
Produto específico MBR e mcr	
PRESENTE	CORRECTA

Se o produto específico de amplificação está presente em uma das reacções de controlo negativo, se são verificados problemas na fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados falsos positivos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Se o produto específico de amplificação está ausente em uma das reacções de controlo positivo, se são verificados problemas na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou ausente) que podem causar resultados falsos negativos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Este kit é capaz de detectar uma quantidade mínima de 10 pares de DNA dos rearranjos MBR ou mcr por reacção de amplificação (limite de detecção do produto, veja parágrafo sobre as Características da performance na pág. 14).

Os resultados das reacções relativas às amostras em análise são utilizados para avaliar a presença do DNA de MBR e mcr como descrito na tabela seguinte:

Amplificação da amostra		Idoneidade da amostra	Resultado do teste	DNA de MBR ou mcr
Produto específico MBR ou mcr	Produto específico ABL			
AUSENTE	AUSENTE	não idónea	não válido	-
	PRESENTE	idónea	válido, negativo	NÃO DETECTADO
PRESENTE	AUSENTE	idónea*	válido, positivo	PRESENTE
	PRESENTE	idónea	válido, positivo	PRESENTE

Se nas reacções de uma amostra estão ausentes o produto específico de amplificação de MBR e mcr ou o do gene ABL da amplificação de controlo, se foram verificados problemas na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou ausente) ou na fase de extracção (ausência de DNA, presença de inibidores ou amostras de partida com um número insuficiente de células) que podem causar resultados falsos negativos. A amostra não é idónea, o teste não é válido e deve ser repetido a partir da extracção de uma nova amostra.

Se na reacção de uma amostra está ausente o produto específico de amplificação de MBR e mcr e está presente o do gene ABL da amplificação de controlo, o DNA de rearranjo MBR e mcr não foi detectado no DNA extraído da amostra mas não é possível descartar que o DNA de rearranjo MBR e mcr esteja presente a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto (limite de detecção do produto, veja parágrafo Características do desempenho na página 14). Neste caso o resultado será um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

***Nota:** Quando em uma reacção de amplificação está presente o produto específico de amplificação dos rearranjo MBR ou mcr e o produto do gene ABL da amplificação de controlo está ausente, a amostra é, de todo modo, idónea e o resultado positivo do teste é válido. No entanto, a reacção de amplificação do gene ABL tem uma eficiência menor (single round) da reacção de amplificação de MBR e mcr (nested).

Cálculo dos limites de detecção

O limite de detecção, quando se utiliza um método particular de extracção e com referência a uma unidade de medida em particular, pode ser calculado a partir do limite de detecção da reacção de amplificação segundo esta fórmula:

$$\text{Limite de detecção} = Fe \times Ee \times Fa \times 10 \text{ cópias DNA / reacção}$$

Fe é a relação entre a unidade de medida de referência e a amostra usada na extracção, por exemplo:

Extracção	unidade de medida	amostra em extracção	Fe
«EXTRAcell»	cópias DNA / 1.000.000 células	500.000 células	$Fe = 10^6 \text{ c.} / 5 \times 10^5 \text{ c.} = 2$

Ee é o inverso da eficiência da extracção, por exemplo:

Extracção	eficiência da extracção	Ee
«EXTRAcell»	eficiência aproximada 100%, ou seja 1,0	$Ee = 1 / 1,0 = 1$

Fa é a relação entre o volume do DNA extraído e o volume usado na reacção de amplificação, por exemplo:

Extracção	volume do DNA extraído	volume em reacção	Fa
«EXTRAcell»	100 µL	5 µL	$Fa = 100 \mu\text{L} / 5 \mu\text{L} = 20$

Quando se utilizam os kit de extracção da ELITechGroup S.p.A. a fórmula seria:

Extracção	Limites de detecção
«EXTRAcell»	Limite de detecção = 400 cópias DNA / 1.000.000 células

LIMITES DO PROCEDIMENTO

Utilizar com este produto somente o DNA extraído das seguintes amostras biológicas: sangue periférico colhido em EDTA, sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio, amostras de biopsias frescas e congeladas.

Não utilizar com este produto o DNA extraído das amostras heparinizadas: A heparina inibe a reacção de amplificação dos ácidos nucleicos e causa resultados não válidos.

Não utilizar com este produto o DNA extraído contaminado com hemoglobina: estas substâncias podem inibir as reacções de amplificação dos ácidos nucleicos podendo causar resultados não válidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenómenos de inibição por parte dos medicamentos antibióticos, anti-virais, quimioterápicos ou imunossupressores.

Os resultados obtidos com este produto dependem da correcta recolheção, transporte, conservação e preparação das amostras; para evitar resultados incorrectos, é necessário portanto, ter particular atenção durante estas fases e seguir atentamente as instruções fornecidas com os produtos para a extracção dos ácidos nucleicos.

O método de amplificação nested dos ácidos nucleicos utilizados neste produto, por causa da sua elevada sensibilidade analítica, está sujeito a contaminação por parte das amostras clínicas positivas para MBR e mcr, dos controlos positivos e dos mesmos produtos da reacção de amplificação. As contaminações levam a resultados falsos positivos. A modalidade de realização do produto pode limitar as contaminações; mas estes fenómenos podem ser evitados somente com uma boa prática das técnicas de laboratório e seguindo atentamente as instruções fornecidas neste manual.

Este produto requer pessoal instruído para a manipulação de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de reagentes classificados como perigosos para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer roupas de trabalho e áreas de trabalho adequadas à manipulação de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de preparações químicas classificadas como perigosas para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer pessoal instruído para o procedimento de biologia molecular, como a extracção, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos para evitar resultados incorrectos.

Este produto requer uma área separada para a extracção / preparação das reacções de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Este produto requer o uso de roupas de trabalho e instrumentos destinados à extracção / preparação das reacções de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o DNA dos rearranjos MBR e mcr não foi detectado no DNA extraído da amostra, mas não se pode descartar que o DNA dos rearranjo MBR e mcr esteja presente a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto (limite de detecção do produto, veja parágrafo Características do desempenho na página 14); neste caso o resultado seria um falso negativo.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, existe um risco latente de obter resultados não válidos, falsos positivos e falsos negativos com este produto. Este risco resíduo não pode ser eliminado ou reduzido posteriormente. Este risco resíduo em situações particulares, pode contribuir a decisões incorrectas com consequências potencialmente graves para o paciente.

CARACTERÍSTICAS DA PERFORMANCE

Sensibilidade analítica: limite de detecção das MBR OligoMIX e mcr OligoMIX

A sensibilidade analítica desta OligoMIX permite identificar a presença de aproximadamente 10 moléculas de DNA branco nos 5 µL de DNA extraído e adicionado à reacção de amplificação.

A sensibilidade analítica do teste, como limite de detecção, foi determinada utilizando como material de referência dois DNAs plasmídicos contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida com espectrofotómetro (pMBR e pmcr).

O DNA plasmídico pMBR foi diluído a uma titulação de 10 cópias / 5 µL e a diluição foi empregada em duas repetições em seis diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a MBR OligoMIX, produto ELITechGroup S.p.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Nº sessões	Nº repetições	Positivos MBR	Negativos MBR
10 cópias pMBR	6	2	12	0

O DNA plasmídico pmcr foi diluído a uma titulação de 10 cópias / 5 µL e empregada em duas repetições em seis diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a mcr OligoMIX, produto ELITechGroup S.p.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Nº sessões	Nº repetições	Positivos mcr	Negativos mcr
10 cópias pmcr	6	2	12	0

Sensibilidade analítica: limite de detecção de ABL OligoMIX

A sensibilidade analítica desta OligoMIX permite identificar a presença de aproximadamente 100 moléculas de DNA branco nos 5 µL de DNA extraído e adicionados à reacção de amplificação.

A sensibilidade analítica do controlo de idoneidade da amostra, como limite de detecção, foi determinada utilizando como material de referência o DNA genómico humano, cuja concentração inicial foi medida com espectrofotómetro.

O DNA genómico humano foi diluído a uma titulação de 5 ng / 5 µL e a diluição foi empregada em duas repetições em sete diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação single round com a ABL OligoMIX, produto ELITechGroup S.p.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Nº sessões	Nº repetições	Positivas ABL	Negativas ABL
5 ng DNA genómico humano	6	2	12	0

Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção nos eventuais polimorfismos

A sensibilidade diagnóstica do teste, como eficiência de detecção nos diversos polimorfismos, foi avaliada pelo confronto de sequências com bancos de dados nucleotídicos.

O exame do alinhamento das regiões seleccionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o rearranjo MBR das **MBR OligoMIX** com as sequências disponíveis no banco de dados das regiões genómicas do rearranjo BCL2-IgH tem demonstrado sua conservação e a ausência de mutações significativas.

O exame do alinhamento das regiões seleccionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o rearranjo mcr das **mcr OligoMIX** com as sequências disponíveis no banco de dados das regiões genómicas do rearranjo BCL2-IgH tem demonstrado sua conservação e a ausência de mutações significativas.

O exame do alinhamento das regiões seleccionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o gene ABL das **ABL OligoMIX** com as sequências disponíveis no banco de dados da região do gene ABL tem demonstrado sua conservação e a ausência de mutações.

Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, como confirmação de amostras negativas, foi verificada realizando-se a análise de amostras de DNA genómico humano normal.

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando como material de referência do DNA genómico humano negativo para o rearranjo MBR e mcr, cuja concentração inicial foi medida no espectrofotómetro.

O DNA genómico humano foi diluído à concentração de 500 ng / 5 µL e a diluição foi empregada em duas repetições em seis diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a MBR OligoMIX, produto ELITechGroup S.p.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Nº sessões	Nº repetições	Positivos MBR	Negativos MBR
500 ng DNA genómico	6	2	0	12

O DNA genómico humano foi diluído à concentração de 500 ng / 5 µL e a diluição foi empregada em duas repetições em seis diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a mcr OligoMIX, produto ELITechGroup S.p.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte.

Amostras	Nº sessões	Nº repetições	Positivos mcr	Negativos mcr
500 ng DNA genómico	6	2	0	12

Especificidade analítica: marcadores potencialmente interferentes

A sensibilidade analítica do teste, como cross reactiva com outros marcadores potencialmente interferentes, foi avaliada para confronto de sequência com bancos de dados nucleotídicos.

O exame do alinhamento das regiões seleccionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o rearranjo MBR das **MBR OligoMiX** com as sequências disponibilizadas no banco de dados de regiões genómicas humanas diferentes das regiões genómicas MBR e IgH, entre as quais as do genoma humano completo, demonstrou a especificidade do sistema de amplificação.

O exame do alinhamento das regiões seleccionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o rearranjo mcr das **mcr OligoMiX** com as sequências disponibilizadas no banco de dados de regiões genómicas humanas das regiões genómicas mcr e IgH, entre as quais as do genoma completo, demonstrou a especificidade do sistema de amplificação.

O exame do alinhamento das regiões seleccionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o gene **ABL** das **ABL OligoMiX** com as sequências disponibilizadas no banco de dados de regiões genómicas humanas diferentes pelo gene humano ABL, entre as quais as do genoma humano completo, demonstrou a especificidade do sistema de amplificação.

Nota: Os dados e os resultados completos dos testes realizados para a avaliação das características do desempenho do produto estão registados na Secção 7 do Fascículo Técnico do Produto "BCL2 oligomix Alert kit", FTP BANG08.

BIBLIOGRAFIA

J. G. Gribben et al. (1994) *Blood* 12: 3800 - 3807

PROBLEMAS E SOLUÇÕES

Produto específico de amplificação presente na reacção de controlo negativo

Possíveis causas	Soluções
Erro durante o deslocamento do DNA extraído.	Abrir um tubo por vez, evitar derramar o conteúdo do tubo, trocar sempre a ponta.
Erro durante o deslocamento do produto de primeira amplificação.	Abrir um tubo por vez, evitar derramar o conteúdo do tubo, trocar sempre a ponta.
Contaminação dos reagentes preparados para a sessão.	Seguir com atenção a diluição e o deslocamento da enzima, trocar sempre a ponta.
Contaminação da água estéril para a diluição da enzima.	Utilizar uma nova divisão de água estéril.
Contaminação do estoque de enzima.	Utilizar uma nova divisão de enzima.
Contaminação da área para a extracção / preparação da reacção de amplificação.	Limpar as superfícies e equipamentos com detergentes aquosos, lavar as batas, substituir tubos e pontas em uso.

Produto específico de amplificação ausente na reacção de Positive Control

Possíveis causas	Soluções
Enzima demasiado diluída ou erro durante o deslocamento da enzima.	Repetir o controlo dos cálculos de diluição, seguir com atenção o deslocamento da enzima e misturar adequadamente.
Erro durante o deslocamento do controlo positivo.	Seguir com atenção o deslocamento do controlo positivo.
Degradação do controlo positivo	Utilizar uma nova divisão do controlo positivo.
Erro de programação do ciclo térmico.	Controlar o ciclo térmico programado no thermal - cycler.
Erro durante o deslocamento do produto de primeira amplificação.	Retirar e distribuir com atenção o produto da primeira amplificação na segunda amplificação.
Erro durante o deslocamento do produto de segunda amplificação no gel.	Carregar com atenção o produto da segunda amplificação no gel.










Produtos não específicos de amplificação presentes nas reacções das amostras

Possíveis causas	Soluções
Enzima demasiado concentrada.	Repetir o controlo dos cálculos de diluição da enzima.
Tempos de preparação da primeira reacção de amplificação demasiado longos.	Manter em gelo os tubos aos quais já se acrescentou o DNA extraído até a transferência no thermal - cycler.
Erro de programação do ciclo térmico.	Controlar o ciclo térmico programado no thermal - cycler.
Excesso de DNA extraído na reacção.	Avaliar a concentração do DNA extraído, não acrescentar mais de 1 µg de DNA para a reacção.

Produto específico de amplificação ausente na reacção ABL de controlo das amostras

Possíveis causas	Soluções
Presença de heparina na amostra de sangue inteiro.	A amostra de sangue deve utilizar EDTA ou citrato de sódio como anticoagulante.
Erro na conservação da amostra de sangue.	O sangue deve ser tratado para a extracção do DNA dentro de poucas horas desde a sua retirada e não deve jamais ser congelado.
Erro na fase de extracção.	Controlar as operações de extracção. Preparar e realizar a extracção seguindo as instruções com muita atenção.
Degradação da amostra extraída.	A extracção do DNA deve ser realizada com material e reagentes sem a presença de DNase. O DNA extraído deve ser conservado a -20°C ou a -70°C.
Erro na fase de amplificação.	Veja as sugestões do parágrafo "Produto específico de amplificação ausente na reacção de controlo positivo".

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS

	Número do catálogo.
	Limite superior de temperatura.
	Código do lote.
	Para utilizar antes do (último dia do mês).
	Dispositivo médico diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Conforme os requisitos da Directiva Europeia 98\79\CE relativo aos dispositivos médicos diagnósticos <i>in vitro</i> .
	Conteúdo suficiente para "N" teste.
	Atenção, consultar as instruções de uso.
	Fabricante.

A aquisição deste produto dá direito ao adquirente utilizá-lo para a amplificação de sequências de ácidos nucleicos com a finalidade de fornecer serviço de diagnóstico humano *in vitro*. Este direito é conferido somente se o produto fornecido é utilizado junto a um produto licenciado para o "Positive Control" e para a detecção da ELITechGroup S.p.A. Nenhum direito geral ou outra licença de tipo diferente deste específico direito de uso é conferido por meio da aquisição.